

Université de Sherbrooke

**EFFETS D'UNE LARYNGITE DE REFLUX SUR LES  
CHÉMORÉFLEXES LARYNGÉS CHEZ L'AGNEAU NOUVEAU-  
NÉ**

Par  
**Anne-Marie Carreau**  
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé en vue de l'obtention du  
grade de *Maître ès sciences* (M.Sc.) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Avril 2012

Membres du jury d'évaluation  
Pr. Jean-Paul Praud, Pr. Robert Dumaine et Pr. Vincent Joseph

© Anne-Marie Carreau, 2012



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-94348-9*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-94348-9*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

## Table des matières

<b>Chapitre I- Introduction</b>	8
<b>1. Définitions</b>	8
1.1 Syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN)	8
1.2 Apparent life-threatening event (ALTE)	8
1.3 Apnées du prématuré	8
<b>2. Larynx : Évolution et fonctions</b>	9
2.1 Anatomie et physiologie du larynx	10
2.2 Innervation du larynx	12
2.3 Récepteurs laryngés	13
<b>3. Chémoréflexes laryngés (CRL)</b>	15
3.1 Stimuli et chémoréflexes laryngés	17
3.2 Origine fœtale des chémoréflexes laryngés	19
3.3 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né prématuré	21
3.4 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né à terme	21
3.5 Conditions reconnues pour modifier les chémoréflexes laryngés	21
<b>4. Implication clinique des chémoréflexes laryngés</b>	24
4.1 Implication dans le syndrome de mort subite du nouveau-né (SMSN)	24
<b>5. Reflux laryngopharyngé (RLP) et laryngite de reflux (LR)</b>	26
5.1 Reflux laryngopharyngé et nouveau-nés	27
5.2 Laryngite de reflux (LR)	30
5.3 Modèles de laryngite de reflux	31
<b>Chapitre II. Objectifs de l'étude</b>	33
<b>Chapitre III. Article</b>	34
<b>Chapitre IV. Discussion</b>	61
<b>1. Modèle de laryngite de reflux</b>	61
1.1 Clinique	61
1.2 Histopathologie	63
<b>2. Effets de la laryngite de reflux sur les chémoréflexes laryngés</b>	64
<b>3. Pertinence clinique de l'étude</b>	65

<b>4. Limitations de l'étude .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Perspectives de l'étude.....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre V. Conclusion .....</b>	<b>70</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>71</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>72</b>

## Liste des figures

Figure 1. Vue laryngoscopique des cartilages et des muscles intrinsèques du larynx .....	11
Figure 2. Nerf vague et innervation laryngée .....	13
Figure 3. Distribution schématique des récepteurs laryngés .....	15
Figure 4. Circuit neuronal impliqué dans les CRL .....	17
Figure 5. Durée du réflexe apnéique en fonction de la concentration en ions Cl <sup>-</sup> contenue dans le lait .....	18
Figure 6. Durée de l'apnée induite par l'eau en fonction de l'âge. ....	19
Figure 7. Modèle d'événements menant au SMSN.....	25

## Liste des abréviations

ALTE	Apparent life-threatening event
CGRP	<i>Calcitonine gene related peptide</i>
CRL	Chémoréflexes laryngés
GERD	Gastro-esophageal Reflux Disease
LR	Laryngite de reflux
RGO	Reflux gastro-oesophagien
RLP	Reflux laryngo-pharyngé
SMSN	Syndrome de mort subite du nourrisson
SOI	Sphincter oesophagien inférieur
SOS	Sphincter oesophagien supérieur
TA	Muscle thyroaryténoïdien
TRPV1	<i>Transient receptor potentiel cation channel subfamily vanilloid member-1</i>
VAI	Voies aériennes inférieures
VAS	Voies aériennes supérieures
VRS	Virus respiratoire syncytial

# Effets d'une laryngite de reflux sur les chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né

Par

Anne-Marie Carreau

Programmes de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

**INTRODUCTION :** Les chémoréflexes laryngés (CRL) sont un ensemble de réflexes déclenchés par la présence de liquide sur le larynx entraînant, chez l'être mature, la toux, la déglutition et la fermeture laryngée, afin de protéger les voies aériennes inférieures contre l'aspiration. Dans certaines conditions, ce réflexe peut mener plutôt à une réponse inhibitrice exagérée entraînant des apnées prolongées et des bradycardies. Ce genre de réponse aux CRL a été associé au syndrome de mort subite du nourrisson. La laryngite associée au reflux gastrique (laryngite de reflux (LR)) serait une des conditions prédisposant à des CRL associés à une réponse délétère. **HYPOTHÈSE :** Le but de cette maîtrise consistait à développer un modèle de LR chez l'agneau nouveau-né de manière à étudier l'hypothèse que la LR accentue la composante cardio-respiratoire des CRL dans la période néonatale. **MÉTHODES :** Un liquide similaire au liquide gastrique (HCl+pepsine à pH=2) (groupe LR n=6) ou du salin (groupe Contrôle n=6) a été injecté de manière répétée (3 fois par jour, pendant 6 jours) à des agneaux nouveau-nés, via un cathéter rétrograde provenant de l'œsophage et dont l'extrémité était située à la portion postérieure du larynx, de manière à reproduire une laryngite de reflux chez le groupe LR. Des CRL ont par la suite été provoqués durant le sommeil à l'aide de 4 solutions différentes (lait, eau distillée, HCl (pH=2) et salin) chez les deux groupes d'agneaux. Des enregistrements polysomnographiques ont été obtenus de manière à enregistrer les phases de sommeil (EEG), les mouvements oculaires (EOG), la fermeture du larynx (EMG du muscle thyroarythénonidien), les mouvements respiratoires (flux nasal et mouvements thoraciques), la pression artérielle (canule artérielle) et la fréquence cardiaque (ECG) chez les agneaux non sédationnés. **RÉSULTATS :** Les agneaux du groupe LR ont présenté les caractéristiques cliniques et histologiques d'une LR modérée, tel qu'observé en clinique chez certains nouveau-nés. La LR a mené à une inhibition respiratoire significativement plus importante que chez le groupe Contrôle incluant la fréquence respiratoire minimale ( $p=0,002$ ), la durée d'apnée ( $p=0,01$ ) et la désaturation en oxygène ( $p=0,03$ ) obtenues suite aux CRL. Le groupe LR a présenté des mécanismes de protection des voies aériennes accentués incluant la toux ( $p=0,08$ ) et la fermeture laryngée ( $p=0,1$ ). Ces mécanismes ont été parfois associés à des réponses exagérées menant à des apnées prolongées et des désaturations majeures ( $SpO_2 < 60\%$ ). Aucune différence n'a été démontrée au niveau des paramètres cardiaques. **CONCLUSION :** Ce modèle de LR a permis de démontrer que la LR augmente l'inhibition respiratoire secondaire aux CRL et peut parfois mener à des événements majeurs. Ce nouveau modèle unique permettra d'étudier les effets de la laryngite de reflux sur d'autres fonctions laryngées telles les déglutitions non nutritives, ainsi que chez des agneaux prématurés ou exposés à la fumée de cigarette.

**Mots clés :** chémoréflexes laryngés, laryngite, polysomnographie, sommeil, mort subite du nourrisson, malaise grave du nourrisson





## Chapitre I- Introduction

### 1. Définitions

#### 1.1 Syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN)

Le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) est défini par le décès d'un enfant de moins de 1 an, subit et inattendu et qui demeure inexpliqué après une investigation post-mortem complète, incluant l'autopsie, l'examen de la scène du décès et une révision du dossier médical (Willinger et al. 1991; Praud 2003; Leiter et al. 2007). Malgré la campagne « dodo sur le dos » conduite dans les années 1990 qui a engendré une diminution de l'incidence de >50 % du SMSN, le SMSN reste une cause fréquente de décès postnatal dans la première année de vie (0,3 % en 2002 au Canada)(Hunt et al. 2006) (Hall et al. 2005) .

#### 1.2 Apparent life-threatening event (ALTE)

L' « apparent life-threatening event » (ALTE) correspond à un événement subit souvent caractérisé par une apnée ou autre changement abrupt de l'état du nouveau-né (changement de la coloration (cyanose), tonus musculaire, toux) qui est terrorisant pour l'observateur (Hall et al. 2005). L'incidence rapportée varie entre 0,05 à 6 % des nouveau-nés (McGovern et al. 2004; Hall et al. 2005). L'ALTE n'est pas considéré comme un SMSN « manqué », ni comme un continuum de gravité du SMSN, mais partage, en partie, les mêmes facteurs de risques que le SMSN. Une grande proportion des cas pourraient être reliés au reflux laryngopharyngé (RLP) et ses conséquences sur les réflexes des voies aériennes supérieures (McGovern et al. 2004; Hall et al. 2005).

#### 1.3 Apnées du prématuré

Les apnées sont définies comme la présence d'une pause respiratoire correspondant à au moins 2 cycles respiratoires « manqués » et d'une durée d'au moins 20 secondes. Les courtes apnées, sans conséquences cliniques majeures sont très fréquentes chez les nouveau-nés. Les apnées accompagnées de bradycardies ou d'une diminution significative de la saturation en oxygène ( $SpO_2 < 80\%$ ), peu importe la durée de l'apnée, sont d'une importance clinique (Reix et al. 2007; Zhao et al. 2011). Les apnées-bradycardies de ce type constituent un problème fréquent chez les

nouveau-nés prématurés, atteignant 7 % des nouveau-nés de 34-35 semaines de gestation, 15 % à 32-33 semaines, 54 % à 30-31 semaines, jusqu'à 85-90% des nouveau-nés de <1000 g ou de <29 semaines (Alden et al. 1972; Zhao et al. 2011).

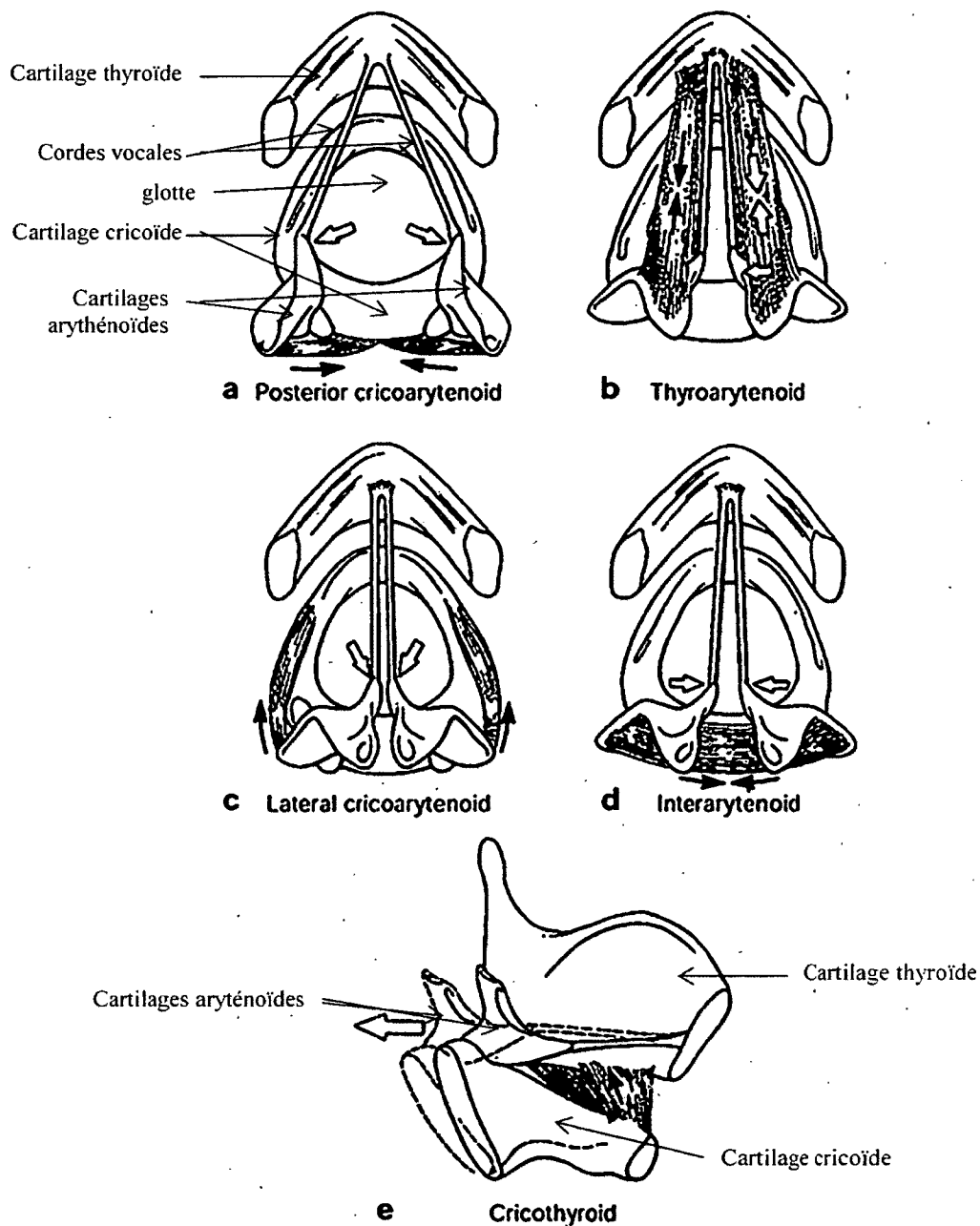
Ces entités cliniques néonatales sont toutes associées à des anomalies du contrôle cardio-respiratoire du nouveau-né, en particulier aux inhibitions cardio-respiratoires associées aux réflexes des voies aériennes supérieures.

## **2. Larynx : Évolution et fonctions**

La colonisation du milieu terrestre par les vertébrés aquatiques, il y a plus de 400 millions d'années, a entraîné plusieurs modifications anatomiques permettant aux poissons de vivre à la fois sur la terre et dans l'eau. Les branchies s'affaissant sous la gravité, l'apparition de poumons s'est associée à l'apparition d'une valve de fermeture: le larynx primitif. Celui-ci permettait à la fois de respirer à l'extérieur de l'eau, mais aussi, d'éviter l'aspiration d'eau dans les voies aériennes inférieures lors de la plongée (Negus 1949; Bartlett 1988; Sasaki et al. 1997). La phylogénie permet de comprendre le rôle premier du larynx, qui en évoluant et se complexifiant, a tout de même conservé son rôle de protection des voies aériennes inférieures (VAI) contre l'aspiration. L'aspiration pulmonaire consiste en l'entrée anormale de liquide ou matériel à l'intérieur des voies aériennes inférieures (trachée et poumons). L'aspiration peut être antérograde, lors de la déglutition ou être rétrograde, lors d'un reflux gastrique laryngo-pharyngé. De plus, le larynx a acquis une fonction de phonation et un rôle de modulation du rythme respiratoire, qui s'effectue par son influence sur la phase expiratoire du rythme respiratoire en modulant le calibre des VAS. Ceci est nécessaire, entre autres lors des manœuvres d'expulsion comme la défécation et l'accouchement (Sasaki et al. 1997). Le larynx, siégeant à la croisée des voies digestives et aériennes, doit présenter une motricité volontaire et réflexe parfaitement coordonnée afin de préserver l'intégrité des voies aériennes inférieures. La complexité du contrôle nerveux de cet organe et la nécessité d'une parfaite coordination réflexe en font un sujet d'étude d'une importance majeure en ce qui concerne l'enfant nouveau-né puisque l'acquisition d'un système complètement mature ne s'acquiert qu'au cours des premiers mois de vie.

## 2.1 Anatomie et physiologie du larynx

Le rôle de protection des VAI conféré au larynx nécessite la mise en place d'un système musculaire intrinsèque et cartilagineux permettant la fermeture (abduction des cordes vocales) ou l'ouverture (adduction des cordes vocales) de la glotte pour éviter l'aspiration de liquide au niveau des VAI. Le muscle cricoaryténoïdien postérieur effectue une traction postérieure sur les cartilages aryténoïdes, ce qui entraîne la rotation externe des cordes vocales (abduction) et permet l'ouverture de la glotte à l'inspiration. Tous les autres muscles intrinsèques (thyroaryténoïdien, cricoaryténoïdien latéral, cricothyroïdien et interaryténoïdien) assurent l'adduction des cordes vocales, donc la fermeture de la glotte (Figure 1).



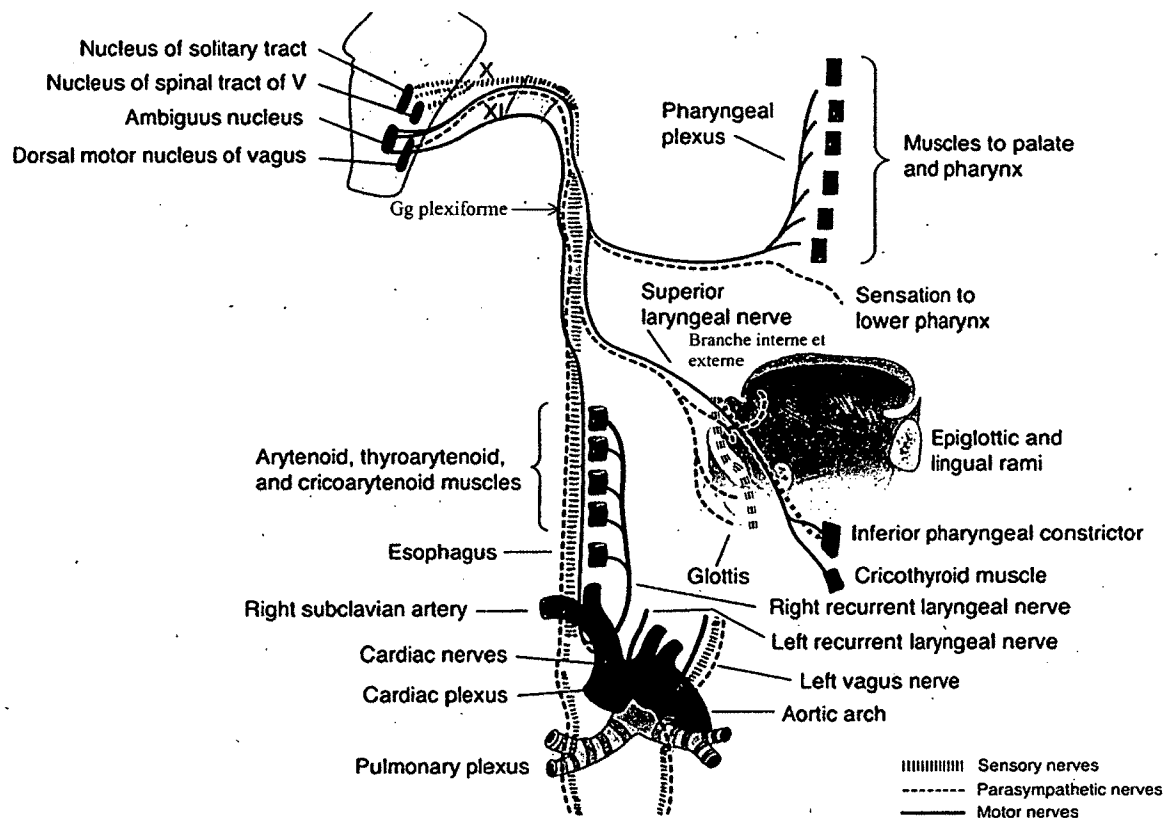
**Figure 1. Vue laryngoscopique des cartilages et des muscles intrinsèques du larynx (Sasaki et al. 1997).**

**A.** Muscle cricoarythénoïdien postérieur permet l'abduction des cordes vocales **B.** Muscle thyroaryténoidien et **C.** Muscle cricoaryténoidien latéral sont les contributeurs majeurs à l'adduction des cordes vocales. **D.** Muscle interaryténoidien contribue à la fermeture de l'aspect postérieur de la glotte. **E.** Muscle cricothyroïdien contribue à tendre les cordes vocales en diminuant la distance entre le cartilage cricoïde et thyroïde, ce qui entraîne un déplacement postérieur de la plaque postérieure du cricoïde.

## 2.2 Innervation du larynx

Le larynx comprend de nombreuses composantes neuronales, sensibles et motrices qui le relient de manière réflexe avec le système nerveux central. En comparaison avec les voies aériennes inférieures, les voies aériennes supérieures sont extrêmement riches en terminaisons nerveuses et en récepteurs sensitifs. Le larynx est la portion des voies aériennes avec la densité la plus élevée de récepteurs. L'innervation laryngée s'effectue par le nerf vague (Xe nerf crânien) qui comprend une composante motrice, sensitive et parasympathique réflexe (figure 2).

L'innervation sensitive du larynx est acheminée principalement par le nerf laryngé supérieur, la deuxième branche majeure du Xe nerf crânien. La branche interne du nerf laryngé supérieur, une branche principalement sensitive, achemine les afférences sensibles de la muqueuse de la portion supraglottique du larynx, ainsi que des récepteurs sensitifs des muscles profonds du larynx et des articulations cricoaryténoïde et thyroépiglottique. La branche externe du nerf laryngé supérieur, bien qu'elle contienne principalement des fibres motrices, transmet les afférences provenant de la muqueuse sous-glottique antérieure et de l'articulation cricothyroïdienne. Le nerf récurrent laryngé, en grande partie moteur, transmet quant à lui les afférences provenant du reste de la muqueuse sous-glottique. Les corps cellulaires des nerfs sensitifs sont situés au niveau du ganglion inférieur du nerf vague (ganglion plexiforme), et transmettent leurs afférences au noyau du faisceau solitaire dans le tronc cérébral. Lorsque les signaux afférents sont intégrés, une réponse motrice peut activer les muscles des voies aériennes supérieures *via* les neurones moteurs du noyau ambigu et du noyau moteur dorsal du vague. Tous les muscles laryngés reçoivent les efférences de branches du nerf X. Le nerf laryngé supérieur (branche externe) assure l'innervation du muscle cricothyroïdien du larynx ainsi que du *levator palatini* (palais) et des muscles constricteurs du pharynx. Le nerf récurrent laryngé innerve tous les muscles intrinsèques du larynx, à l'exception du muscle cricothyroïdien (Figure 2) (Sasaki et al. 1997; Jadcherla et al. 2010).



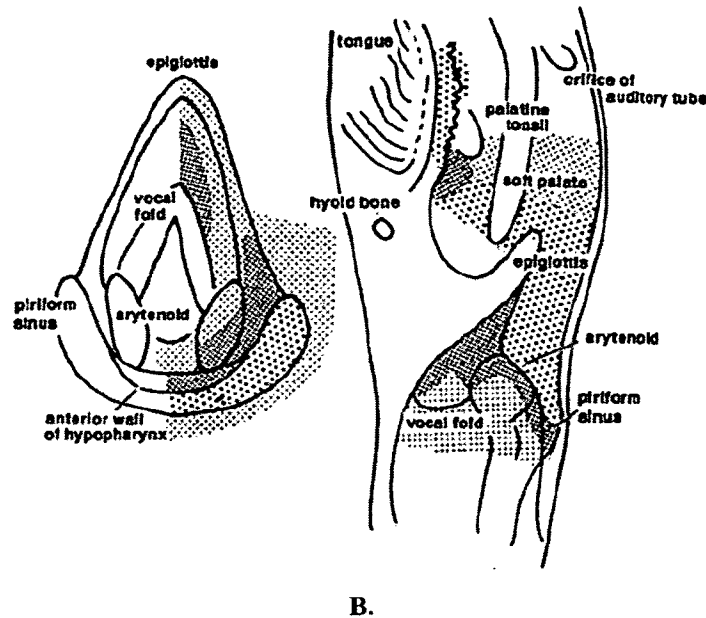
**Figure 2. Nerf vague et innervation laryngée.**

Modifié de Waxman SG, Clinical neuroanatomy, 26<sup>e</sup> édition : <http://accessmedicine.com>  
 Trajet du nerf vague, les branches motrices sont représentées en trait continu, les branches sensibles en barres parallèles et l'innervation parasympathique réflexe en traits pointillés.

### 2.3 Récepteurs laryngés

Le larynx possède 2 principaux types de récepteurs : les mécanorécepteurs et les chémorécepteurs. Les mécanorécepteurs servent principalement à moduler le rythme, la fréquence et l'amplitude respiratoire (Widdicombe 2001; Reix et al. 2007). Ceux-ci incluent les récepteurs à pression (70 % des mécanorécepteurs), qui répondent soit à la pression négative, positive ou aux deux types et servent principalement à moduler le calibre des voies aériennes supérieures (VAS), de manière à assurer l'ouverture de la glotte en réaction à la pression négative présente lors de l'inspiration. Les *récepteurs au mouvement* (28 % des mécanorécepteurs) sont situés à proximité des muscles intrinsèques laryngés et perçoivent les contractions musculaires de manière à moduler celles-ci. Les *récepteurs au débit* (2 % des mécanorécepteurs) sont sensibles au froid et sont stimulés par la différence de température de

l'air entre l'inspiration (plus froid) et l'expiration. Les chémorécepteurs laryngés ont pour rôle la protection des VAI. Plusieurs types de récepteurs ont été identifiés dans la littérature comme ayant un rôle potentiel de chémorécepteurs. Ces récepteurs ont de multiples morphologies. Certains sont organisés en structures semblables aux papilles gustatives et se retrouvent principalement au niveau de l'épiglotte et du cartilage aryénoïde. Leurs fibres contiennent de la substance P, Calcitonin gene related peptide (CGRP), 5-HT, galanine et enképhaline (Widdicombe 2001). Bien que leur rôle ne soit pas tout à fait clair, il semble de plus en plus accepté que ceux-ci n'aient pas un rôle gustatif, mais soient plutôt des chémorécepteurs impliqués dans les chémoréflexes laryngés. Les études ont montré l'existence d'autres chémorécepteurs possédant des terminaisons nerveuses libres. Ceux-ci incluent les *récepteurs à l'irritation laryngés*, qui correspondent aux terminaisons nerveuses de petites fibres myélinisées Aδ présents dans la muqueuse laryngée et tout le long des voies aériennes inférieures. Ceux-ci répondent à une multitude de stimuli chimiques et mécaniques irritants. Deux types de récepteurs à l'eau ont aussi été décrits. Ils réagissent soit aux liquides hypoosmolaires (eau), soit aux solutions avec une faible concentration en ions chlorure (Anderson et al. 1990; Hanamori 2001; Reix et al. 2007). Les terminaisons nerveuses des fibres C correspondent aux terminaisons nerveuses de petites fibres non myélinisées situées dans la muqueuse et la sous-muqueuse laryngée. Peu d'études ont été effectuées sur ce type de récepteurs et les connaissances demeurent peu détaillées. Le récepteur TRPV1 (*transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid member-1*) est présent à la terminaison des fibres C et répond, de manière similaire aux *récepteurs à l'irritation*, à une multitude de stimuli irritants, incluant la capsaïcine, les ions H<sup>+</sup> et les produits inflammatoires (Reix et al. 2007). D'autres canaux ioniques sensibles aux ions H<sup>+</sup> ont été rapportés sur la muqueuse laryngée des agneaux nouveau-nés, tel que TASK-1, mais leur rôle en tant que chémorécepteurs impliqués dans la protection des VAI est incertain (Reix et al. 2007; Praud 2010). Les études portant sur l'innervation laryngée ont démontré que l'épiglotte, les replis ary-épiglottiques et la portion postérieure de la glotte sont les régions anatomiques possédant l'innervation sensitive la plus dense du larynx (Sasaki et al. 1997). Les récepteurs laryngés sont situés de manière avantageuse afin de protéger les VAI du larynx puisqu'il s'agit des régions les plus fréquemment en contact avec les agresseurs potentiels des VAI.



**Figure 3. Distribution schématique des récepteurs laryngés (Reix et al. 2007)**

Cette figure illustre la densité des récepteurs laryngés selon la distribution anatomique. La densité des points correspond à la densité des récepteurs sensitifs retrouvés dans chaque région du larynx. On note une densité plus importante dans les régions postérieures de la glotte et sur le versant laryngé de l'épiglotte. **A.** Vue laryngoscopique du larynx. **B.** Coupe sagittale du larynx et du pharynx.

### 3. Chémoréflexes laryngés (CRL)

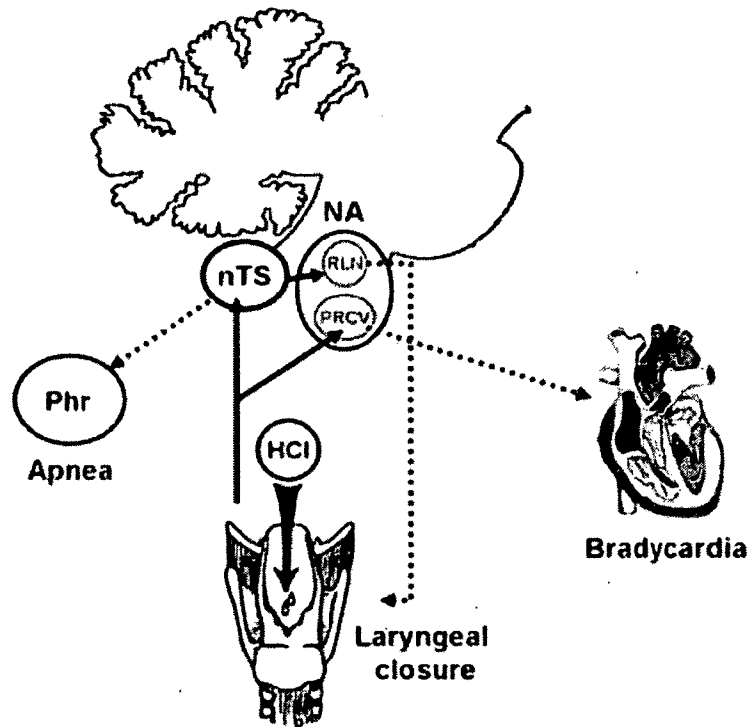
Dans les années 1970, Johnson *et al.* ont démontré que l'instillation d'eau sur la muqueuse laryngée d'agneaux nouveau-nés *via* une trachéotomie élicitait des déglutitions répétées, une apnée prolongée, de la toux et une réaction d'éveil (Johnson P. 1975). Depuis, ces observations ont été corroborées chez plusieurs espèces incluant le chat, le chien, le cochon, le singe, le nouveau-né humain et, plus récemment, le rat. (Downing et al. 1975; Harned et al. 1978; Sutton et al. 1978; Lucier et al. 1979; Boggs et al. 1982) (Lindgren et al. 1996a; Xia et al. 2008).

Il est maintenant accepté que le contact de liquide avec les chémorécepteurs de la muqueuse laryngée déclenche une série de réflexes protecteurs, les chémoréflexes laryngés qui comprennent de la toux, des déglutitions, et une réaction d'éveil lorsque ceux-ci se produisent lors du sommeil. Les CRL assurent habituellement la fonction principale du larynx, soit la



protection des voies aériennes inférieures contre l'aspiration. Chez l'être immature neurologiquement ou dans certaines situations cliniques, ces réflexes peuvent avoir des conséquences néfastes, alors qu'ils peuvent entraîner une réponse exagérée. Ces CRL dits de **type fœtal** se manifestent habituellement avec une réponse vagale prononcée et comprennent des apnées, laryngospasmes, bradycardies et, lorsque importants, des désaturations significatives. Cette réponse de type vagale est contrebalancée par une réponse sympathique qui entraîne une hypertension artérielle systémique et une redistribution du flux sanguin vers les organes vitaux (Thach 2001; Reix et al. 2007; Thach 2010). Les CRL de **type fœtal** ont été associés aux apnées-bradycardies du prématuré, aux ALTE (apparent life-threatening event) et au déclenchement d'une suite d'événements pouvant mener au syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) (Leiter et al. 2007).

Le circuit neuronal impliqué dans les CRL de type fœtal est illustré dans la figure 4. Les afférences des CRL proviennent des neurones sensitifs du nerf laryngé supérieur et font relais au niveau du noyau du faisceau solitaire où l'information est intégrée et une réponse réflexe est enclenchée par l'intermédiaire de neurones sensitifs secondaires. La réponse réflexe est transmise au noyau ambigu qui *via* les motoneurones efférents active les muscles constricteurs de la glotte entraînant le laryngospasme et la toux. De plus, la transmission des afférences du nerf laryngé supérieur par des réseaux d'interneurones en relation avec les centres respiratoires entraîne une inhibition des motoneurones phréniques, causant une apnée prolongée. De plus, le nerf laryngé supérieur envoie directement des projections aux neurones vagues pré-ganglionnaires situés au niveau du noyau ambigu, entraînant la bradycardie (Reix et al. 2007).



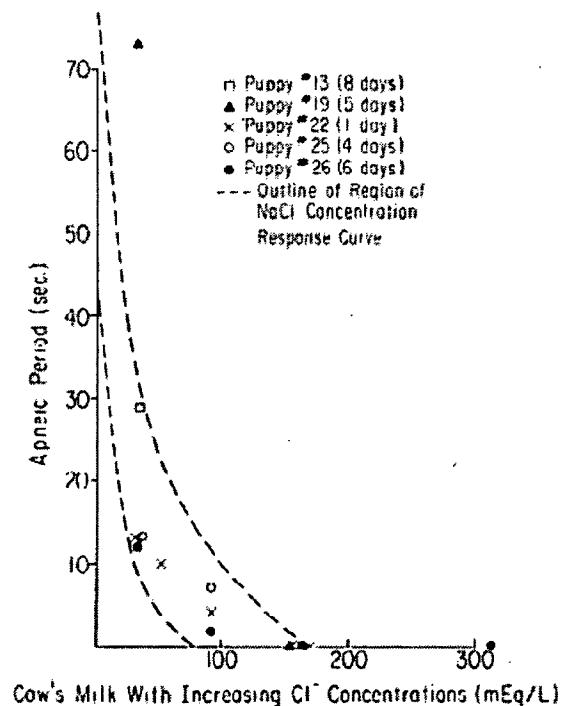
**Figure 4. Circuit neuronal impliqué dans les CRL de type foetal (Reix et al. 2007)**

Cette figure illustre les voies afférentes et efférentes par lesquelles sont médiés les CRL. **nTS** : noyau de faisceau solitaire; **Phr** : nerf phrénique; **RLN** : nerf récurrent laryngé; **NA** : noyau ambigu; **PRCV** : neurones vagues cardiaques pré-ganglionnaires

### 3.1 Stimuli et chémoréflexes laryngés

Différents stimuli ont été démontrés comme déclenchant des CRL. Dans les années 1980 un groupe a étudié plusieurs stimuli, instillés via une trachéotomie, de manière à définir ceux qui créaient une réponse apnéique au contact du larynx chez un groupe de chiens nouveau-nés anesthésiés (Boggs et al. 1982). Ceux-ci ont pu démontrer que l'eau élicitait de manière constante un réflexe apnéique. De plus, ils ont déterminé que l'absence ou la faible concentration en ions  $\text{Cl}^-$  ( $< 80 \text{ mEq/L}$ ) d'une solution représentait un facteur important permettant d'éliciter ce

réflexe (Figure 5). Une grande concentration en ions  $K^+$  semblait aussi déclencher le réflexe laryngé. Il est de plus en plus accepté dans la littérature que l'acide, de manière indépendante à la concentration en ions  $Cl^-$ , est aussi un facteur déterminant de la stimulation des chémoréflexes laryngés. Les solutions fortement acides ou alcalines stimulent les chémorécepteurs laryngés, même lorsque la concentration en ions chlorures est identique à celle du plasma (Wetmore 1993; Thach 2001). La solution saline isoosmolaire déclenche peu de réflexes et permet même d'arrêter ceux-ci, lorsqu'une solution présente sur le larynx est lavée avec le salin. Les chémorécepteurs laryngés semblent être des récepteurs à adaptation lente, qui déclenchent des influx nerveux tant que la solution demeure à la surface de la muqueuse laryngée (Boggs et al. 1982; Thach 2001).



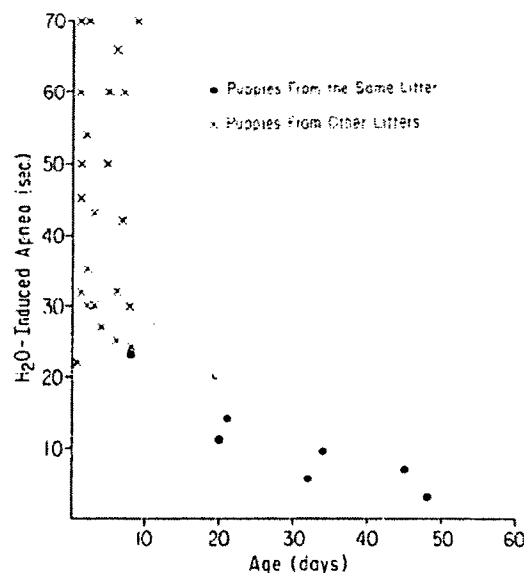
**Figure 5. Durée du réflexe apnéique en fonction de la concentration en ions  $Cl^-$  contenue dans le lait (Boggs et al. 1982)**

Cliniquement, les chémoréflexes laryngés peuvent être provoqués lors de la déglutition, tout simplement avec des sécrétions salivaires, ou encore lors de l'alimentation, avec du lait, par exemple, chez le nouveau-né. Ceux-ci peuvent aussi être déclenchés lors d'un reflux acide ou non-acide rétrograde (provenant de l'estomac) lorsque celui-ci atteint le larynx et le pharynx. De

plus, l'eau distillée présente par condensation dans les tubulures chez les nouveau-nés ventilés par voie nasale pourrait aussi déclencher ce type de réflexes.

### 3.2 Origine foetale des chémoréflexes laryngés

Historiquement, les études ont été conçues de manière à identifier les éléments qui entraînaient des apnées prolongées lors de CRL. Boggs et Bartlett ont démontré chez les chiens nouveau-nés sous anesthésie générale et *via* une trachéotomie que la durée de l'apnée était inversement proportionnelle à l'âge postnatal des animaux (Figure 6) (Boggs et al. 1982). En résumé, les études ont démontré qu'il y a une diminution du nombre de déglutitions répétées et de la durée des apnées associées aux CRL, ainsi qu'une augmentation progressive de la toux et des réactions d'éveil, avec la maturation périnatale du système nerveux. Ainsi, les réponses deviennent de plus en plus appropriées afin de permettre la protection des voies aériennes inférieures et de manière à ne pas causer d'effets délétères (Thach 2001).



**Figure 6. Durée de l'apnée induite par l'eau en fonction de l'âge (Boggs et al. 1982).**

Les CRL potentiellement délétères observés dans la période d'immaturité neurologique semblent provenir de la persistance de réflexes protecteurs foetaux (Thach 2001; Reix et al. 2007;

Thach 2010). Dans la vie pré-natale, le fœtus est entouré de liquide amniotique qu'il déglutit constamment, ce qui permet d'assurer le maintien du volume intra-utérin. La lumière des voies aériennes inférieures est remplie de liquide pulmonaire qui assure une pression intra-pulmonaire positive, ce qui est essentiel au développement pulmonaire. L'aspiration de liquide amniotique dans les voies aériennes est aussi indésirable chez le fœtus que chez le nouveau-né, car il contient des débris cellulaires, méconium, lanugo potentiellement nocifs pour les poumons. Le larynx sert alors de barrière étanche entre ces deux milieux de composition différente. Tel que mentionné ci-haut, l'application d'une solution à concentration d'ions chlorures inférieure à 80-100mEq/L sur la muqueuse laryngée produit habituellement des CRL (Boggs et al. 1982; Thach 2001). De manière intéressante, la composition d'ions chlorures du liquide pulmonaire est d'environ 170 mEq/L et celle du liquide amniotique de 80 mEq/L. Nous supposons que le seuil de référence d'activation des CRL se trouve au niveau de la concentration en ions chlore présente dans le liquide amniotique, de manière à prévenir l'aspiration de liquide amniotique dans les poumons fœtaux (Reix et al. 2007). Le mécanisme le plus efficace pour protéger les voies aériennes inférieures de l'aspiration de liquide **chez un fœtus** consiste en la fermeture complète du larynx (laryngospasme) associé à une apnée centrale prolongée (absence de mouvements respiratoires secondaire à l'arrêt d'influx nerveux d'origine centrale au diaphragme). Ce mécanisme n'est pas délétère pour le fœtus, car celui-ci tire son oxygénation du système circulatoire maternel par le placenta et le cordon ombilical. Le fœtus étant entouré d'un milieu aqueux où il ne peut avoir accès à l'oxygène *via* le système pulmonaire en cas d'hypoxémie, les réflexes de préservation de l'oxygène comprennent une redistribution du flux sanguin aux organes vitaux, une bradycardie et une diminution du métabolisme, contrairement à l'augmentation de la ventilation minute rencontrée chez l'adulte. Ce réflexe de conservation est préservé chez le nouveau-né et a une répercussion lors des CRL (Leiter et al. 2007). Ces réflexes présents chez le fœtus en milieu intra-utérin se rapprochent fortement des CRL retrouvés chez les nouveau-nés neurologiquement immatures. C'est pourquoi ces CRL sont dits de **type fœtal**.

### 3.3 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né prématuré

Les observations cliniques, renforcées par les observations obtenues chez les agneaux prématurés (St-Hilaire et al. 2007) montrent clairement que la prématurité engendre des CRL de type fœtal, potentiellement délétères (Praud 2010). Ceux-ci se manifestent par des apnées importantes, bradycardies et désaturations parfois menaçantes pour la vie du prématuré lorsque de l'eau distillée ou de l'acide chlorhydrique est instillé sur le larynx des prématurés (nés 14 jours pré-terme) au 7e jour de vie post-natale. De plus, il a été démontré que la maturation post-natale des agneaux nouveau-nés prématurés entraînait une diminution considérable des réponses cardio-respiratoires inhibitrices (St-Hilaire et al. 2010), puisque la réponse aux CRL au 14e jour de vie post-natale se rapprochait des réponses obtenues chez les nouveau-nés à terme.

### 3.4 Chémoréflexes laryngés chez l'agneau nouveau-né à terme

Comparativement aux CRL de type fœtal, les CRL de type protecteur se manifestent par une apnée de brève durée, de la toux et des déglutitions de manière à éliminer le liquide situé sur le larynx, une fermeture laryngée de courte durée et une réaction d'éveil si le CRL se produit durant le sommeil. Contrairement à d'autres études de la littérature (Downing et al. 1975; Lee et al. 1977), ces études étant effectuées chez des animaux sous anesthésie ou sédation importante, notre laboratoire a démontré, chez les agneaux nouveau-nés **à terme** sans sédation que les CRL déclenchés par l'eau ou l'acide étaient de **type protecteur** (St-Hilaire et al. 2005). Même si une maturation post-natale a été démontrée dans la littérature, les CRL chez les agneaux à terme étaient semblables à ceux retrouvés chez le sujet neurologiquement mature (adulte).

### 3.5 Conditions reconnues pour modifier les chémoréflexes laryngés

Tels que décrits ci-haut, les CRL semblent servir de réponse protectrice chez les nouveau-nés à terme et en santé, alors que la réponse aux CRL est exagérée et délétère chez les nouveau-nés prématurés. Cliniquement, il est reconnu que certains nouveau-nés **à terme** présentent, tout de même, des réponses cardio-respiratoires exagérées aux CRL. Certaines conditions de la vie post-natale semblent donc prédisposer les nouveau-nés à présenter des CRL de type fœtal. La

reconnaissance des conditions qui exacerbe la réponse cardio-respiratoire inhibitrice causée par les CRL est essentielle afin d'identifier les nouveau-nés à risque d'effets délétères des CRL tels les apnées-bradycardies ou le SMSN. Dans la littérature, plusieurs conditions sont reconnues comme étant reliées à une réponse cardio-respiratoire délétère (Praud 2010).

### 3.5.1 Sédation

Il est reconnu que la sédation et l'anesthésie entraînent une certaine dépression respiratoire et une augmentation de la durée d'apnée. L'effet de la sédation légère sur les chémoréflexes laryngés a été étudié chez les porcelets et a permis de démontrer que la sédation, même si légère et induite avec de faibles doses de prométhazine, entraînait une altération des mécanismes protecteurs des voies aériennes inférieures et une augmentation de la réponse inhibitrice cardio-respiratoire suite aux CRL induits par de l'acide chlorhydrique (McKelvey et al. 2001). L'effet de la sédation légère a aussi été étudié sur la réponse d'éveil suite à une obstruction des voies respiratoires chez l'agneau nouveau-né. La sédation entraînait une latence d'éveil augmentée suite à une obstruction du débit respiratoire, menant parfois à des hypoxémies profondes (Jakubowska et al. 1996). Ces démonstrations que la sédation, même si légère, entraîne une inhibition cardio-respiratoire suite à un stimulus et une diminution des mécanismes protecteurs des voies aériennes, sont d'importance, puisque la plupart des études ayant mené aux descriptions des CRL dans la littérature sont effectuées chez des animaux sédationnés ou anesthésiés.

### 3.5.2 Hyperthermie

Les études épidémiologiques portant sur le syndrome de mort subite du nourrisson ont identifié à plusieurs reprises l'hyperthermie comme étant un facteur de risque important pour la mort subite du nourrisson (Stanton 1984; Nelson et al. 1989; Ponsonby et al. 1993; Guntheroth et al. 2001). La présence de fièvre secondaire aux infections, de chauffage trop élevé de la chambre du nouveau-né ou de vêtements ou couvertures trop isolantes présentent des facteurs de risque avec des risques relatifs tous très élevés (RR 15-50 selon les études) (Guntheroth et al. 2001). En élevant la température corporelle de 2,5 degrés chez des porcelets décérébrés de 3-16 jours, l'équipe de Bartlett Jr. a démontré que l'hyperthermie entraînait une inhibition respiratoire prolongée associée aux CRL par rapport aux animaux contrôles (Curran et al. 2005; Bohm et al. 2007; Xia et al. 2007). Cette réaction semble causée par un effet central au niveau du tronc

cérébral, puisque l'application d'eau distillée sur les récepteurs laryngés de porcelets avec une température corporelle augmentée n'entraînait pas une augmentation des potentiels d'action enregistrés directement au niveau du système nerveux périphérique afférent (Xia et al. 2006). De plus, l'élévation de la température de l'eau instillée sur les récepteurs laryngés d'animaux avec une température corporelle normale n'a pas non plus entraîné d'effet sur les CRL (Curran et al. 2005).

### 3.5.3 Exposition à la fumée de cigarette

L'exposition périnatale à la fumée de cigarette environnementale est considérée comme un facteur de risque reconnu pour le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) (Anderson et al. 1997; Adgent 2006). Une étude effectuée chez des agneaux nouveau-nés a démontré que l'injection intraveineuse de nicotine entraînait une augmentation de l'inhibition cardiorespiratoire engendrée par les CRL, suggérant que l'exposition post-natale au tabac prédispose au SMSN par l'altération des CRL (Sundell et al. 2003). De la même manière, une étude de notre laboratoire a démontré que l'exposition d'agneaux nouveau-nés à terme à la fumée de cigarette inhalée en période post-natale, ce qui correspond à une situation plus proche de la réalité clinique que l'injection intraveineuse de nicotine, entraînait aussi une réponse respiratoire inhibitrice plus importante que chez les sujets contrôles, ainsi que des mécanismes de protection des VAI moins efficaces (St-Hilaire et al. 2010). Par contre, ces réactions n'étaient pas cliniquement importantes au point d'entraîner des CRL potentiellement dangereux pour la vie, laissant supposer que des facteurs de risques additionnels sont nécessaires pour mener au SMSN.

### 3.5.4 Infection par le virus respiratoire syncytial (VRS)

Jusqu'à présent, un seul groupe a pu démontrer l'influence de l'infection au VRS sur les CRL chez le nouveau-né (Lindgren et al. 1996a; Lindgren et al. 1996b). Les données disponibles dans la littérature proviennent d'une étude où des CRL ont été élicités chez des nouveau-nés (< 6 mois) présentant une clinique compatible avec une bronchiolite à VRS et la réponse obtenue a été comparée à des contrôles sains, mais qui, pour la plupart, étaient référés pour des événements d'apnée ou d'ALTE ou faisaient partie de la fratrie d'un nouveau-né victime d'un SMSN. Cette étude a démontré une inhibition respiratoire suite aux CRL plus importante chez le groupe



VRS+, mais sans inhibition cardiaque significative (Lindgren et al. 1996a). De la même manière, des agneaux nouveau-nés infectés au VRS ont présenté une inhibition cardiorespiratoire exagérée suite au CRL comparativement au groupe contrôle (Lindgren et al. 1996b).

Les données obtenues dans ces études sont compatibles avec les observations épidémiologiques qui relient l'infection au VRS au SMSN et aux apnées chez le nouveau-né (Ponsonby et al. 1992; Lindgren et al. 1996a; Leiter et al. 2007).

### 3.5.5 Hypoxie, hypercapnie et acidose

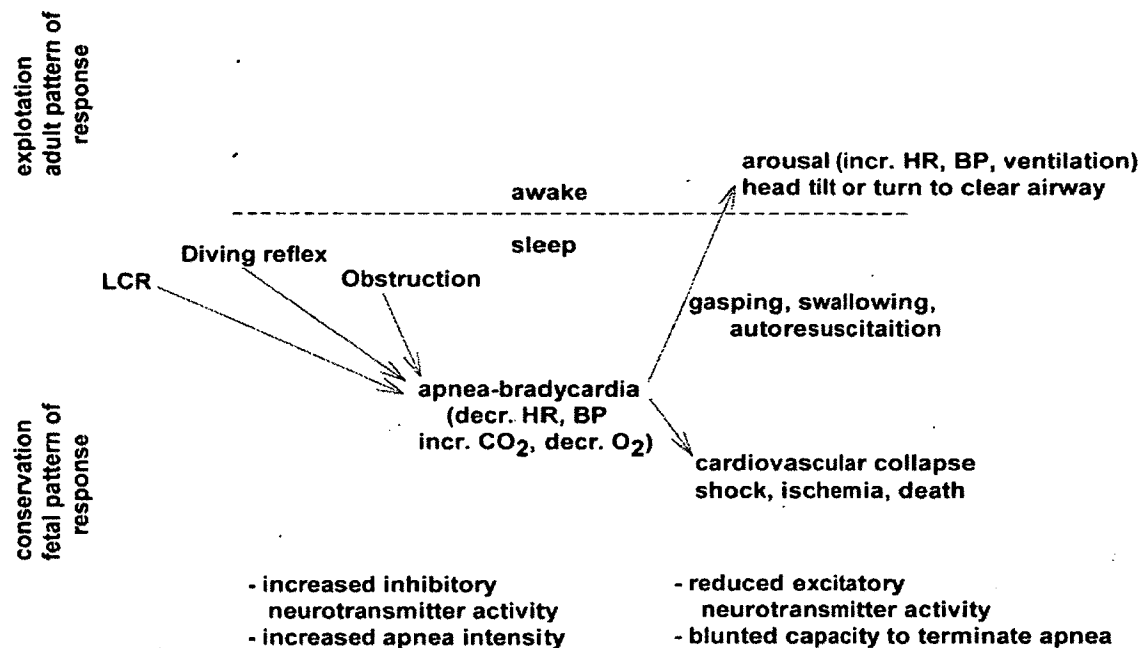
Certaines études ont démontré que les CRL induits dans des conditions hypoxiques entraînaient une inhibition cardiorespiratoire importante cliniquement (Lanier et al. 1983; Wennergren et al. 1989). Plus récemment, l'acidose et l'hypercapnie ont été identifiées comme des éléments pouvant prédire la sévérité de la réponse respiratoire aux CRL dans des conditions normoxiques chez des porcelets (Heman-Ackah et al. 2009).

## 4. Implication clinique des chémoréflexes laryngés

### 4.1 Implication dans le syndrome de mort subite du nouveau-né (SMSN)

La théorie du triple risque est le modèle explicatif du SMSN le plus reconnu dans la littérature jusqu'à présent. Elle soutient que 3 facteurs doivent être présents concomitamment chez le nouveau-né pour entraîner un décès subit : 1) une anomalie préexistante du contrôle cardio-respiratoire ou de la réaction d'éveil; 2) une période de vulnérabilité sur le plan neurologique (entre 2-4 mois); 3) un événement déclencheur qui entraîne subitement un déséquilibre des fonctions cardio-respiratoires durant le sommeil.

Les CRL, lorsqu'ils entraînent une réponse cardio-respiratoire inhibitrice de type fœtal, peuvent être l'élément déclencheur d'une suite d'événements pouvant mener au SMSN. Leiter *et al* ont récemment élaboré un modèle physiopathologique de la suite d'événements menant au SMSN (figure 7) (Leiter et al. 2007).



**Figure 7. Modèle d'événements menant au SMSN (Leiter et al. 2007).**

Les événements déclenchant la suite d'événements menant au SMSN se produisent habituellement lors du sommeil puisqu'il s'agit d'une période propice où les réflexes cardiorespiratoires « inhibiteurs » sont exagérés. Le SMSN débute par un événement déclencheur qui entraîne une apnée prolongée, comme c'est le cas lors des CRL de type fœtal. Chez les nouveau-nés sains, une apnée prolongée, via l'hypoxémie et l'hypercapnie qu'elle cause, active les chémorécepteurs centraux et périphériques, ce qui augmente la ventilation minute, provoque une réaction d'éveil qui permet un mouvement de la tête si celle-ci est positionnée de manière à ne pas avoir accès à suffisamment d'oxygène (ex. en décubitus ventral, tête coincée dans l'oreiller). Cela aura pour effet de terminer de manière rapide une apnée et évitera les conséquences graves de celle-ci. Cependant, si le nouveau-né présente une altération de la réaction d'éveil, l'hypoxémie et l'hypercapnie s'aggraveront et entraîneront ultimement les réflexes de gasping hypoxique et d'auto-réanimation, réflexes qui se déclenchent en cas d'hypoxémie profonde (Thach 2008). Le gasping hypoxique se produit en situation extrêmement hypoxique, lorsque la PaO<sub>2</sub> atteint 8-10 mmHg (Thach 2008). Il correspond à de grandes respirations avec un temps inspiratoire bref et une

fermeture de la glotte en fin d'inspiration, de manière à assurer l'oxygénation maximale aux alvéoles. Si de l'oxygène est disponible à ce moment, le gasping peut être efficace pour rétablir une  $\text{PaO}_2$  acceptable, ce qui permet le retour à une situation hémodynamique suffisante à assurer la perfusion des organes vitaux. Si les mécanismes de dernier recours échouent, le nouveau-né décèdera par collapsus cardio-vasculaire. Des éléments exagérant les CRL comme l'hyperthermie ou des éléments asphyxiants comme le nouveau-né en décubitus ventral ou la présence de draps au niveau du visage pourraient contribuer à accélérer le processus.

La période fenêtre de 2 à 4 mois où le nouveau-né est dans une période de risque augmenté de SMSN correspond à la période de transition sur le plan neurologique entre des réflexes du tronc cérébral à effets plus inhibiteurs (« pattern » fœtal) aux réflexes adultes à effets plus activateurs. La persistance de réflexes à pattern fœtal contribue à l'événement déclencheur qu'est le CRL de type fœtal, alors que les réflexes adultes, qui n'ont pas encore atteint leur maturité, entraînent une réaction d'éveil et d'activation cardio-respiratoire sous-optimale.

Le CRL de type fœtal est donc au cœur de la problématique du SMSN et l'identification des facteurs prédisposant à des apnées-bradycardies prolongées (CRL de type fœtal) est donc un élément majeur de la compréhension de cette problématique.

## **5. Reflux laryngopharyngé (RLP) et laryngite de reflux (LR)**

Parmi les conditions post-natales expliquant potentiellement une réponse aux CRL exagérée et possiblement délétère chez des nouveau-nés apparemment sains, à l'instar de l'inflammation laryngée causée par le VRS, l'inflammation du larynx causée par le reflux gastrique est suspectée, puisqu'il s'agit d'une situation cliniquement fréquente chez le nouveau-né. Une étude pilote publiée en 2005 s'est penchée sur l'effet du traitement de la laryngite de reflux sur les apnées-bradycardies et désaturations du prématuré (Vermeulen et al. 2005). Douze nouveau-nés prématurés avec des apnées-bradycardies persistantes malgré un traitement usuel et présentant des signes de RLP ont été inclus dans cette étude. Tous les patients présentaient un œdème

laryngé compatible avec une LR. Le traitement de l'œdème et de l'inflammation laryngée a été effectué avec soit des corticostéroïdes inhalés (n=6) ou des corticostéroïdes inhalés + oraux (n=6). Tous les nouveau-nés du groupe corticostéroïdes inhalés + oraux ont présenté une amélioration des apnées-bradycardies, parfois marquée, entre 24-48h après le début du traitement. De la même manière, 4/6 nouveau-nés du groupe corticostéroïdes inhalés seulement ont aussi présenté une amélioration des apnées. Cette étude nous démontre que la LR semble être en cause dans le problème des apnées-bradycardies du nouveau-né.

### 5.1 Reflux laryngopharyngé et nouveau-nés

Le reflux gastro-œsophagien (RGO) correspond à la remontée du contenu gastrique dans l'œsophage, alors que le reflux laryngopharyngé (RLP) correspond à la remontée du contenu gastrique jusqu'au niveau du pharynx et du larynx. Celui-ci est très fréquent chez le nouveau-né pour plusieurs raisons anatomo-physiologiques. Les nouveau-nés, étant la majorité du temps en décubitus dorsal, sont prédisposés au reflux rétrograde dû à une diminution de l'effet de la gravité comparativement à l'enfant qui se tient assis. De plus, l'alimentation fréquente, liquide et de grand volume (180 ml/kg/j) favorise une surdistension gastrique. Par ailleurs, chez les nouveau-nés prématurés ou hospitalisés, la mise en place de tube nasogastrique contrevient aux mécanismes physiologiques anti-reflux.

#### 5.1.1 Mécanismes anti-reflux

La physiopathologie du reflux repose sur une différence de pression entre l'estomac et l'œsophage. La pression gastrique est constamment changeante selon le cycle respiratoire et les changements de pression intra-abdominale. La principale barrière anti-reflux consiste en la pression exercée au niveau de la jonction gastro-œsophagienne principalement par la contraction tonique du sphincter œsophagien inférieur (SOI) (contraction intrinsèque des muscles lisses) et la contraction extrinsèque du diaphragme crural. Les nouveau-nés prématurés présentent un faible tonus du SOI dû à l'immaturité des mécanismes de contrôle du sphincter. Cependant, la pression générée par le SOI est tout de même suffisante pour prévenir le reflux gastrique (5-10 mmHg) (Omari et al. 1998). Il est maintenant clair que le mécanisme principal en cause dans le reflux gastrique est la relaxation transitoire du SOI. Contrairement à la relaxation normale du SOI qui s'effectue lors d'une déglutition pharyngée afin de permettre au bol alimentaire de progresser

vers l'estomac, la relaxation transitoire du SOI s'effectue spontanément, persiste de manière plus prolongée ( $> 10$  sec), est plus importante et est accompagnée d'une inhibition de la contraction du diaphragme crural et du corps de l'œsophage (Omari et al. 1998; Davidson et al. 2001; Omari et al. 2002). Neurophysiologiquement, ces relaxations sont engendrées par un réflexe vasovagal initié par des mécanorécepteurs gastriques et dont l'efférence est régulée par le tronc cérébral. Les relaxations transitoires du SOI semblent être plus fréquentes dans la période postprandiale, probablement secondaire à la distension gastrique et ont pour utilité de permettre le passage de l'air afin d'éviter la surdistension gastrique. Les reflux gastriques se produisent donc plus fréquemment en période postprandiale, au moment où le pH gastrique est faiblement acide (pH 4-7). Au contraire, les relaxations transitoires du SOI qui se produisent à distance d'un repas ( $>2-4$ h), même si plus faibles en nombre, sont plus acides (pH $<4$ ). La grande majorité des reflux gastriques chez les nouveau-nés sont donc à pH faiblement acide. Une étude effectuée chez les nouveau-nés prématurés et à terme, a permis de démontrer que les nouveau-nés présentant une maladie relative au RLP ne présentaient pas des relaxations transitoires du SOI plus fréquentes que chez les nouveau-nés sains, mais qu'ils avaient plus de reflux liquides et des RLP plus acides (Omari et al. 2002). Il est maintenant bien établi que la relaxation transitoire du SOI est le mécanisme principal entraînant le reflux gastro-œsophagien et la maladie liée au RLP chez le nouveau-né, comme c'est le cas chez l'adulte et l'enfant plus âgé. Les autres mécanismes de barrière anti-reflux ne semblent pas impliqués dans l'augmentation de la fréquence des RLP chez le nouveau-né. Ceux-ci incluent le sphincter œsophagien supérieur (SOS) qui est composé de la contraction tonique du muscle cricopharyngé. Les nouveau-nés, même si prématurés présentent une contraction normale du SOS et une relaxation normale à la déglutition (Omari 2003). La clairance œsophagienne suite à la présence de liquide gastrique rétrograde dans l'œsophage s'effectue grâce au péristaltisme œsophagien. Le péristaltisme primaire (engendré par une déglutition) ou secondaire (engendré par la présence de reflux gastrique dans l'œsophage) a été démontré comme étant efficace chez le nouveau-né à terme (Omari 2003).

### 5.1.2 Reflux physiologique et pathologique

Le reflux pathologique (Gastroesophageal Reflux Disease (GERD)) est défini comme l'association de signes physiques à l'exposition fréquente de la lumière œsophagienne ou des structures laryngées et pharyngées au reflux gastrique. Chez l'adulte ou l'enfant plus âgé, le monitoring de l'exposition œsophagienne au reflux s'effectue à l'aide d'un monitoring continu pendant 24 du pH œsophagien (pH-métrie œsophagienne). L'étalon d'or pour le diagnostic du GERD repose sur l'index de reflux obtenu avec la pH-métrie œsophagienne, correspondant au pourcentage du temps où le pH est inférieur à 4 au cours de l'étude. Étant donné que les RLP du nouveau-né sont principalement faiblement acides, cette définition est difficilement applicable au reflux pathologique du nouveau-né. Il n'y a donc aucun étalon d'or accepté pour le diagnostic du GERD chez le nouveau-né. Les données normales de l'index de reflux (% temps où  $\text{pH} < 4$ ) chez les nouveau-nés à terme asymptomatiques seraient d'environ 13 % (95e percentile) dans la première année de vie alors qu'il diminue à environ 6 % à l'âge d'un an (Omari 2003). (Yellon et al. 2001). Plus récemment, le développement d'une sonde à monitoring de l'impédance œsophagienne, couplée à la pH-métrie a permis d'étudier la présence de reflux non-acides chez le nouveau-né. Une étude effectuée chez 21 nouveau-nés prématurés asymptomatiques, à l'aide d'impédance-métrie, a démontré un nombre médian de reflux œsophagiens de 71 en 24 heures, desquels 25,4 % étaient acides ( $\text{pH} < 4$ ) et 72,9 % étaient faiblement acides ( $\text{pH} 4-7$ ) (Lopez-Alonso et al. 2006). Le reflux physiologique est donc relativement fréquent chez le nouveau-né asymptomatique et le diagnostic repose alors sur la présence de signes cliniques associés au reflux. Les signes cliniques décrits avec le GERD ne font pas non plus consensus (Golski et al. 2010). Celui-ci peut se manifester par des signes généraux tels l'irritabilité, la diminution de l'état général, des postures particulières ou des grimacements aux boires, la perte de poids ou l'absence de gain de poids, des pleurs lors des boires ou un refus de s'alimenter. Il peut aussi y avoir des symptômes respiratoires comme le stridor, la raucité de la voix, la toux, le wheezing, les apnées ou ALTE, etc (Rudolph et al. 2001; Yellon et al. 2001; Ulualp et al. 2007; Golski et al. 2010). Bien que le reflux physiologique soit fréquent chez les nouveau-nés, <10 % de ceux-ci présenteraient un GERD (Omari 2003).

## 5.2 Laryngite de reflux (LR)

La laryngite de reflux (LR) ou l'inflammation du larynx causée par le RLP est une conséquence pathologique du RLP, en particulier chez le nouveau-né qui est beaucoup plus sujet que l'adulte au reflux gastrique rétrograde très haut au niveau du larynx et du pharynx. La LR est une entité bien décrite dans la littérature, en particulier chez l'adulte où celle-ci est plus étudiée (Koufman 1991; Rudolph et al. 2001; Yellon et al. 2001; Koufman et al. 2002; Vaezi 2003a; Vaezi 2003b; Vaezi et al. 2003; Vaezi 2006; Ulualp et al. 2007). Bien que celle-ci soit bien décrite, il n'existe pas d'étalon d'or pour le diagnostic de la LR. Le diagnostic repose sur la présence de symptômes cliniques, des signes à la laryngoscopie et l'objectivation de RGO à la pH-métrie. Tel que mentionné auparavant, la pH-métrie comme outil diagnostique est difficilement applicable au nouveau-né vu la grande proportion de reflux faiblement acides. Le diagnostic est donc fait à la lumière de l'ensemble des signes cliniques, des données paracliniques et parfois à la laryngoscopie. La laryngoscopie peut démontrer la présence de signes associés à l'inflammation laryngée : l'œdème et l'érythème du tissu laryngé, des polypes des cordes vocales, ulcérations, des nodules ou granulomes sur les cordes vocales (Vaezi 2003b; Vaezi 2006). Il est plutôt controversé si ces signes sont spécifiques à la laryngite de reflux ou s'ils peuvent être associés à d'autres types d'inflammation (Vaezi 2003c; Vaezi 2006 {Vaezi, 2003 #656})

Parfois, l'analyse histopathologique de biopsies laryngées peut être utilisée pour confirmer la présence d'une LR. Très peu d'études ont jusqu'à présent permis d'identifier les caractéristiques histologiques de la LR (Haggitt 2000; Maronian et al. 2003) (Johnston et al. 2007). L'inflammation laryngée causée par le reflux peut se manifester par une hyperplasie de l'épithélium squameux (normalement présent au-dessus de la glotte) avec un infiltrat inflammatoire chronique dans la sous-muqueuse. Un processus inflammatoire plus important peut entraîner un épithélium atrophique, ulcéré avec des dépôts de fibrine, du tissu de granulation et de la fibrose sous-muqueuse (Haggitt 2000). Ces changements inflammatoires ne semblent pas spécifiques pour la LR, mais une distribution plutôt postérieure des changements inflammatoires est hautement suggestive en présence d'une clinique compatible.

### 5.3 Modèles de laryngite de reflux

La physiopathologie de l'atteinte inflammatoire de la LR a été étudiée par certains groupes, de manière à déterminer les principaux éléments contribuant à l'inflammation laryngée (Ludemann et al. 1998; Adhami et al. 2004; Tack 2005; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). C'est dans ce contexte que les premiers modèles animaux de LR ont vu le jour. Ces études ont démontré que des solutions mimant un reflux acide (pH 1.5-4) et d'autant plus lorsque combiné avec de la pepsine (enzyme protéolytique contenue dans le liquide gastrique) pouvaient engendrer de l'inflammation lorsqu'instillés directement sur le larynx, généralement traumatisé au préalable (Ludemann et al. 1998; Carron et al. 2001; Adhami et al. 2004; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). Ces modèles n'étaient cependant pas conçus pour étudier l'effet d'une LR subaiguë à chronique chez des animaux avec un larynx sain par ailleurs (non traumatisé). Suite à une revue extensive de la littérature, nous avons répertorié l'existence de 5 modèles de LR (Koufman 1991; Ludemann et al. 1998; Carron et al. 2001; Adhami et al. 2004; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). Suite à notre étude, un modèle supplémentaire de LR chez le rat a été publié (Asaoka et al. 2011). Quatre de ces études ont été effectuées chez des animaux avec des lésions laryngées effectuées au préalable, de manière à étudier l'inflammation laryngée dans un modèle de reconstruction laryngée ou de sténose sous-glottique (Koufman 1991; Carron et al. 2001; Adhami et al. 2004; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). Certains de ces modèles consistaient à utiliser la visualisation directe laryngée sous anesthésie générale ou sédation pour injecter une solution de pepsine acidifiée pour mimer le reflux (Koufman 1991; Adhami et al. 2004) ou via un tube de pharyngostomie sans sédation (Ludemann et al. 1998; Carron et al. 2001; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). Bien que tous ces modèles aient été créés de manière à engendrer une LR subaiguë (de 2 à 4 semaines) et que l'inflammation ait été objectivée de manière histopathologique, aucun de ces modèles n'a rapporté la présence de signes cliniques chroniques chez les animaux, sauf un stridor biphasique associé à l'anxiété de l'instillation (Ludemann et al. 1998). De manière intéressante, un des lapins de cette étude, même s'il ne s'agissait pas d'un modèle néonatal, a présenté une apnée prolongée lors de l'instillation de la solution acidifiée et a nécessité une réanimation avec de l'oxygénothérapie. De plus, l'équipe d'Adhami et al. a aussi décrit des laryngospasmes sévères chez 3 des animaux lors de l'injection, entraînant même un décès.





## **Chapitre II. Objectifs de l'étude**

Étant donné l'importance clinique des CRL de type fœtal et l'évidence clinique et expérimentale que les nouveau-nés à terme et en santé présentent des CRL de type protecteur, l'identification de facteurs post-nataux prédisposant à la survenue de CRL de type fœtal demeure un des axes de recherche majeur du laboratoire où j'ai effectué mes études de Maîtrise.

Ce projet de Maîtrise s'inscrit dans le contexte où les effets de la laryngite de reflux sur les CRL n'ont jamais été étudiés dans la littérature, alors qu'il s'agit d'un problème fréquent en clinique chez le nouveau-né par ailleurs sain.

Les objectifs de ce projet de Maîtrise étaient :

- 1) Mettre au point un modèle de laryngite de reflux subaiguë chez l'agneau nouveau-né, de manière à ce qu'il présente les caractéristiques cliniques et histologiques d'une laryngite de reflux du nouveau-né.
- 2) Étudier les effets cardio-respiratoires, les réactions d'éveil et les mécanismes protecteurs des VAI induits par des CRL chez un modèle valide de LR chez l'agneau nouveau-né.

### **Chapitre III. Article**

#### **Effects of Simulated Reflux Laryngitis on Laryngeal Chemoreflexes in Newborn Lambs**

**Auteurs de l'article :** Anne-Marie Carreau<sup>†</sup>, Hugues Patural<sup>¶</sup>, Nathalie Samson<sup>†</sup>, Alexandre A Doueik<sup>§</sup>, Julie Hamon<sup>†</sup>, Pierre-Hugues Fortier\*, Jean-Paul Praud<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Unité de recherche néonatale, Départements de pédiatrie et physiologie; <sup>§</sup>Département de pathologie; \*Département de chirurgie, Service d'ORL, Université de Sherbrooke, QC, Canada

<sup>¶</sup>Unité de soins intensifs pédiatriques, CHU St Étienne, 42055 – St Étienne, France

**Statut de l'article :** publié

Journal of Applied Physiology, 111 : 400-406, 2011.

#### **Avant-propos :**

Lors de ma maîtrise, j'ai effectué la revue de littérature, j'ai élaboré la conception du modèle animal et participé à la mise au point du modèle animal utilisé dans cet article. De plus j'ai effectué toute les expérimentations présentées dans cet article, incluant l'instrumentation chirurgicale, les soins aux animaux, les instillations répétées, les enregistrements polysomnographiques, les nécropsies ainsi que les analyses histologiques aidée des autres étudiants et professionnels de recherche du laboratoire. J'ai aussi effectué l'analyse des résultats et certaines analyses statistiques présentées. J'ai, par ailleurs, contribué grandement à l'écriture de l'article, aidée par la professionnelle de recherche du laboratoire et par mon directeur de recherche Pr Jean-Paul Praud.

# EFFECTS OF SIMULATED REFLUX LARYNGITIS ON LARYNGEAL CHEMOREFLEXES IN NEWBORN LAMBS

Anne-Marie Carreau<sup>†</sup>, Hugues Patural<sup>¶</sup>, Nathalie Samson<sup>†</sup>, Alexandre A Doueik<sup>§</sup>, Julie  
Hamon<sup>†</sup>, Pierre-Hugues Fortier\*, Jean-Paul Praud<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Physiology; <sup>§</sup>Department of Pathology; \*ENT Division, Department of Surgery, Université de Sherbrooke, QC, Canada -- J1H 5N4

<sup>¶</sup>Pediatric Intensive Care Unit, CHU St Étienne, 42055 – St Étienne, Cedex 02, France

**Short title:** Reflux laryngitis and laryngeal chemoreflexes

**Address for correspondence and proofs:**

Jean-Paul Praud MD PhD

Phone: (819) 346-1110, ext 14851

Departments of Pediatrics and Physiology Fax: (819) 564-5215

Université de Sherbrooke

email: Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca

J1H 5N4, QC Canada

## RÉSUMÉ

Des données de la littérature nous indiquent que la laryngite de reflux (LR) est associée aux apnées-bradycardies du nouveau-né. Le but de cette étude était de développer un modèle de LR permettant de vérifier l'hypothèse que la LR exacerbe la composante cardio-respiratoire des chémoréflexes laryngés (CRL) dans la période néonatale. Une solution semblable au liquide gastrique (2 ml de salin physiologique avec HCl à pH 2+pepsine 300U/ml) (groupe LR, n=6) ou du salin physiologique (groupe contrôle, n=6) ont été injectés de manière répétée sur la partie postérieure du larynx, 3 fois par jours, pendant 6 jours consécutifs *via* un cathéter rétrograde introduit dans l'œsophage cervical. Les agneaux instillés avec la solution simulant un reflux gastrique ont présenté des signes cliniques de LR et une laryngite modérée à l'évaluation histologique. Des CRL ont par la suite été induits durant le sommeil par l'injection de 0,5 ml de HCl (pH2), d'eau distillée, de lait ou de salin physiologique au niveau du vestibule laryngé *via* un cathéter supraglottique transcutané. En général, la LR a entraîné une inhibition respiratoire significativement plus importante que le groupe Contrôle suite aux CRL, incluant la durée d'apnée la plus longue ( $p=0,01$ ), la fréquence respiratoire minimale ( $p=0,002$ ) et la désaturation en oxygène la plus importante ( $p=0,03$ ) suite aux CRL. Aucun effet n'a été observé sur les paramètres cardio-vasculaires. Pour conclure; 1) notre modèle ovin unique de LR neonatal présente les caractéristiques cliniques et histologiques d'une LR; 2) la présence d'une LR chez l'agneau nouveau-né augmente l'inhibition respiratoire entraînée par les CRL, parfois menant à des apnées et désaturations sévères.

## ABSTRACT

It has been suggested that reflux laryngitis (RL) is involved in apneas-bradycardias of the newborn. The aim of the present study was to develop a unique RL model in newborn lambs in order to test the hypothesis that RL enhances the cardiorespiratory components of the laryngeal chemoreflexes (LCR) in the neonatal period. Gastric juice surrogate (2 ml of normal saline solution with HCl pH 2 + pepsin 300U/ml) (RL group, n = 6) or normal saline (Control group, n = 6) was repeatedly injected onto the posterior aspect of the larynx, 3 times a day for 6 consecutive days, *via* a retrograde catheter introduced into the cervical esophagus. Lambs instilled with gastric juice surrogate presented clinical signs of RL, as well as moderate laryngitis on histological observation. Laryngeal chemoreflexes were thereafter induced during sleep by injection of 0.5ml of HCl (pH 2), ewe's milk, distilled water or saline into the laryngeal vestibule *via* a chronic, transcutaneous supra-glottal catheter. Overall, RL led to a significantly greater respiratory inhibition compared to the Control group during LCR, including longer apnea duration ( $p = 0.01$ ), lower minimal respiratory rate ( $p = 0.002$ ) and a more prominent decrease in  $SpO_2$  ( $p = 0.03$ ). No effects were observed on cardiac variables. In conclusion, 1) our unique neonatal ovine model presents clinical and histological characteristics of RL; 2) the presence of RL in newborn lambs increases the respiratory inhibition observed with LCR, at times leading to severe apneas and desaturations.

**KEYWORDS:** Polysomnography, sleep, apparent life-threatening event, apnea of prematurity, sudden infant death syndrome.

## INTRODUCTION

Laryngeal chemoreflexes (LCR) are a group of reflexes triggered in mammals by the contact between a gaseous irritant, such as ammonia vapor, or a liquid, such as milk or gastric juice, and receptors of the laryngeal mucosa. These reflexes, comprised of laryngeal closure, cough, swallowing (and arousal if necessary) in a mature organism, constitute a major protection mechanism against tracheal aspiration of liquids (20,22). However, in certain conditions, LCR can conversely be responsible for apneas, bradycardias and hypoxemia. The latter, while reminiscent of fetal-type LCR, can be so severe that they are likely responsible for a certain proportion of apneas of prematurity, most life-threatening events of infancy and some cases of sudden infant death syndrome (11,13,20,22,31).

Gastric refluxes, especially laryngopharyngeal refluxes, are a very frequent and normal occurrence in the neonatal period. While most gastric refluxes in infants are weakly acid, mainly due to frequent feeds, it is nevertheless well documented that acid refluxes occur in infants. This includes healthy, preterm neonates (34 weeks postconceptional age), where a mean number of 16 acid laryngopharyngeal refluxes per day has been reported (17). In such cases, the acid-activated pepsin present in the refluxate can induce reflux laryngitis (RL) (1,12).

Reflux laryngitis has been suggested to be one condition responsible for LCR with severe cardiorespiratory events in infants (32). However, evidence for the responsibility of RL in increasing the occurrence and severity of cardiorespiratory events during LCR is very weak. The main objective of our study was thus to compare LCR characteristics in RL lambs and control lambs, testing the hypothesis that increased cardiorespiratory inhibition is present in RL lambs, as compared with controls. However, given that we were unable to find a neonatal RL model in the literature, a neonatal ovine RL model had to be designed beforehand to perform the study.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

A total of twelve newborn lambs, distributed equally into two groups (RL group and Control group), were included in this study. The study protocol was approved by the ethics committee for animal care and experimentation of our institution.

### **Surgical instrumentation and recording equipment**

#### **Surgical instrumentation**

Aseptic surgery was performed under general anesthesia (2% isoflurane, 30% N<sub>2</sub>O, 68% O<sub>2</sub>) upon the day of arrival (postnatal *day 1*). Anesthesia was preceded by an intramuscular injection of ketamine (10 mg/kg), atropine sulfate (0.1 mg/kg) and morphine (0.016 ml/kg) and an intravenous bolus (10 ml/kg) of Ringer's lactate solution. One dose of ketoprofen (3 mg/kg) was also injected intramuscularly for analgesia and repeated if needed 12h later. Antibiotics (5 mg/kg gentamicin and 0.05 ml/kg duplocilline) were administered intramuscularly prior to surgery and daily thereafter. Lambs were mechanically ventilated through an orotracheal tube (4.5 mm) throughout the surgical procedure. Bipolar platinum needle electrodes (made from F-E2 needle-electrodes, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) were inserted into both thyroarytenoid muscles (TA; a glottal adductor) through the lateral aspect of the thyroid cartilage for electrical activity (EMG) recording. Both electrodes were then glued on the external surface of the thyroid cartilage. Two right-angled needle electrodes (E7-12, Grass Technologies) were inserted into the parietal cortex directly through the skull, at the level of the lambda suture, 1 cm from the midline, for electrocorticogram (ECoG) recording. A third needle electrode (F-E2M, Grass Technologies) was inserted under the scalp as a ground. Two platinum needle electrodes (F-E2, Grass Technologies) were also inserted subcutaneously into the outer lower and the inner upper region of the right eye socket for electrooculogram (EOG) recording. For electrocardiogram (ECG) recordings, two additional needle electrodes (F-E2M, Grass Technologies) were inserted under the periosteum of the 5<sup>th</sup> rib, on both sides of the thorax, and directly glued on the rib. A catheter was introduced into the right carotid artery to monitor arterial pressure during the LCR. Leads from all electrodes were subcutaneously tunneled to exit on the back of the lambs. In



addition, a supraglottal catheter was inserted transcutaneously to allow injection of liquids into the laryngeal vestibule, as previously described (6). Briefly, a 16 G infusion catheter was securely positioned such that its tip protruded 5-7.5 mm above the anterior part of the glottis. A plastic tubing (internal diameter 1 mm) was subcutaneously tunneled in the neck of the lamb and connected to the external part of the supraglottal catheter, which protruded 15-20 mm externally at the level of the anterosuperior aspect of the thyroid cartilage. Correct catheter positioning above the glottis was monitored throughout the insertion procedure by direct laryngoscopy. Finally, a retrograde catheter was introduced into the esophagus for simulated reflux laryngitis induction (see below). After identification of the thyroid gland, the esophagus was exposed caudally over 10 cm to visualize the right recurrent laryngeal nerve trajectory. An 8 Fr Levine catheter connected to a trocar from a Hemovac drainage tube was introduced into the esophagus *via* the mouth of the lamb and exited by an incision in the cervical esophagus wall, which avoided the recurrent laryngeal nerve. Under direct laryngoscopic visualization, the rostral extremity of the esophageal catheter was positioned 5 mm above the posterior rim of the larynx. The catheter was then secured to the cervical esophageal incision with biological glue, then sutured to the skin. The caudal part of the Levine catheter was finally subcutaneously tunneled to exit on the lamb's back.

#### Neonatal ovine model of simulated reflux laryngitis

A unique, chronic neonatal ovine model of simulated reflux laryngitis was designed for the purpose of the present study. Following surgical instrumentation, lambs were randomly assigned to either the RL group or Control group. In the RL group, 2 ml of a normal saline solution containing pepsin (300 U/ml, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON) and hydrochloric acid (HCl, pH 2.0) was instilled 3 times a day for 6 consecutive days (postnatal days 3 to 8) using the esophageal catheter. Application of an acidified pepsin solution on the larynx to mimic an acid gastric reflux has been previously shown to induce laryngitis (1,12). In addition, our acidified pepsin solution was chosen to be representative of the gastric content of a newborn infant, whose pepsin concentration of gastric aspirates varies between 43 and 683 U/ml in the neonatal period (M Armand, personal communication, Marseille, France). Meanwhile, lambs in the Control group were instilled with 2 ml of physiological saline 3 times a day for 6 consecutive days, *via* their esophageal catheter.

Validation of our neonatal simulated reflux laryngitis model was based on clinical signs and histological evaluation. Daily clinical follow-up included weighing of lambs and monitoring to detect the presence of chronic cough, difficulties to feed and altered bleating. For the purpose of the study, a semi-quantitative score on a scale of 10 (with 10 = 100% normal bleat, 9 = 90% normal bleat, ...) was used to evaluate altered bleating in each lamb and was assessed daily by the same observer. Correct positioning of the esophageal catheter was confirmed before euthanasia by direct laryngoscopy. Following euthanasia, the larynx was observed macroscopically for the presence of edema, ulceration and erythema. Finally, a pathologist expert in larynx assessment (AD) scored epithelial inflammation based on a scale used in a previous reflux laryngitis model. The glottis, epiglottis and first tracheal ring were scored on a scale of 15 depending on the worse criteria encountered for each following category: epithelial changes (intraepithelial inflammation, squamous metaplasia, erosion, ulceration) and subepithelial changes (stromal inflammation, periglandular inflammation and granulation or fibrosis) (12).

#### Recording equipment

Lamb instrumentation was completed immediately before recordings. Nasal flow was recorded from both nostrils using a double thermocouple wire (iron/constantan, type J; Omega Engineering, Stamford, CT) secured in an adapted dog muzzle. Rib cage and abdominal respiratory movements were also recorded by respiratory inductance plethysmography (Respirace, Monitoring systems, Miami Beach, FL). A pulse oximeter sensor (Masimo Radical, Masimo, Irvine, CA) was attached at the base of the tail for continuous monitoring of arterial hemoglobin saturation ( $SpO_2$ ) and pulse wave. Finally, the subcutaneous plastic tubing connected to the supraglottal catheter was attached to a custom-designed, radiotelemetry-driven injector, where the liquids to be injected were warmed and maintained at the lamb's body temperature.

To obtain data from prolonged recordings in nonsedated lambs, under the least possible restraining conditions, all leads from the EMG, EOG, ECoG and ECG electrodes, as well as nasal flow, were connected to our custom-designed radio telemetry transmitter (14). The pulse oximeter sensor was also connected to a second custom-designed radiotelemetry transmitter. The raw EMG signals were rectified, integrated and moving time averaged (100 ms). All parameters

were continuously recorded using AcqKnowledge software (version 3.7.3, Biopac Systems, Santa Barbara, CA). In addition, an observer was continuously present to note all events occurring during recordings.

### **Design of the study**

All lambs were housed with their mother in our animal quarters until experimental day. Following surgical instrumentation and RL induction, polysomnographic recordings were performed in nonsedated lambs on postnatal *days 9 and 10* between 6:00 AM and 12:00 PM. Lambs were placed in a Plexiglas chamber (1.2 x 1.2 x 1 m) and comfortably positioned on a mattress without contention during recordings. Laryngeal chemoreflexes were induced by random injection of 0.5 ml of saline (0.9% NaCl, pH = 5.5, osmolarity = 326 mosM), distilled water (pH = 5.7), hydrochloric acid (HCl) diluted in saline (pH = 2, osmolarity = 295 mosM) and ewe milk (pH = 6.6, osmolarity = 298 mosM) *via* the supraglottal catheter. All four solutions were injected once in quiet sleep (QS) and once in active sleep (AS) on each experimental day (i.e., a total of 2 injections per solution and per state of alertness). In addition, the supraglottal catheter was systematically flushed with 1 ml of saline between each injection of test solutions (dead space of the catheter 0.5 ml). Each animal was given at least 15 min of recovery time between two injections. Events such as agitation, cough, arousal and/or full awakening were noted by an observer throughout the recording sessions. Finally, following completion of the recordings, euthanasia was performed by an intravenous injection of 100 mg/kg of pentobarbital. Correct electrode and catheter positioning was systematically verified at autopsy.

### **Data analysis**

#### **States of alertness**

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define sleep states (23). Cortical arousal from quiet sleep (QS) was defined by the association of a change in ECoG (decrease in amplitude + increase in frequency) for 3 seconds or more, with at least two of the following modifications: a 10% increase in heart rate (HR) or change in respiratory rate (RR) or movement (9). Arousal from active sleep (AS) was recognized by direct observation of the lamb

and disappearance of intense EOG activity. Full awakening was defined when the lamb was still awake after 1 minute (7).

### Laryngeal chemoreflexes

The main objective of the study was to assess the effect of RL on LCR. In addition, we queried whether this effect was different in QS vs. AS, and from one experimental solution to another. Analysis of the LCR was performed as described previously within the first minute following each laryngeal injection (28). First, the cardiorespiratory responses were assessed as follows. The percentage of decrease in heart rate [ $\% \text{dec HR} = (\text{HR}_{\text{BL}} - \text{HR}_{\text{min}}) * 100 / \text{HR}_{\text{BL}}$ ] was calculated, with  $\text{HR}_{\text{BL}}$  representing the baseline HR value averaged over 30 s before injection, and  $\text{HR}_{\text{min}}$  representing the minimal HR value observed after injection. The percentage of increase in mean arterial pressure, decrease in respiratory rate and decrease in transcutaneous oxygen saturation ( $\text{SpO}_2$ ) were calculated in the same manner. Any presence of bradycardia (defined by a  $\% \text{dec HR} > 30\%$ ) was noted, and the number and total summed duration of bradycardias were tabulated. The number of apneas (defined as at least two missed breaths relative to baseline breathing) and total summed duration of apneas were recorded within the first minute after laryngeal stimulation. Respiratory LCR duration was measured as the time duration between the onset of the LCR and resumption of three consecutive breaths similar to baseline RR. The number of swallows, recognized as a brisk, high-amplitude and short-duration TA EMG (21), was tallied. In addition, total summed duration of TA EMG bursts longer than 0.3 sec, considered as indicating laryngeal closure (of narrowing) unrelated to swallowing, was calculated. The number of coughs (including laryngeal expiratory reflexes, which could not be discerned from coughs in our study) was also inferred from visual observation, as well as analysis of TA EMG and respiratory inductance plethysmograph signals. Finally, the presence of arousal or full awakening was noted.

### Statistical analysis

Quantitative data were expressed as mean  $\pm$  SD, whereas qualitative, binary data (arousal and awakening, yes/no) were expressed as relative frequency. Statistical analyses were performed on raw data for all variables. The effect of RL was assessed for baseline physiological values by the

Student's t test. For the laryngeal chemoreflexes, quantitative data were analyzed through a general linear model 3-way ANOVA for repeated measures using Proc mixed of SAS software (version 9.1.3) with group, solutions and sleep states as the independent variables. Binary data were analyzed with a logistic regression model and count data were analyzed by the Friedman's test. Differences were deemed significant if  $p < 0.05$ . In addition, given the relatively small number of studied lambs (related both to the complexity of the ovine model and ethical constraints), it was decided to give full consideration to the presence of a significant trend, defined as  $p < 0.1$ .

## **RESULTS**

A total of 94 laryngeal stimulations were performed in the Control group (n = 6) [QS: 11 saline, 12 distilled water, 12 HCl, 12 milk. AS: 12 saline, 11 distilled water, 12 HCl, 12 milk] compared to 81 laryngeal stimulations in the RL group (n = 6) [QS: 12 saline, 11 distilled water, 12 HCl, 12 milk. AS: 8 saline, 9 distilled water, 8 HCl, 9 milk].

### **Reflux laryngitis group**

Clinical presentation of RL was variable from one lamb to the other. Hoarsened bleat (score over 7/10) at the end of the 6 days of instillation, up to absent bleating in 2 lambs, was observed in 5/6 lambs from the RL group vs. 1/6 lambs in the Control lamb. Chronic cough was also observed in 2 lambs from the RL group. In addition, one lamb from the RL group, who presented cough during attempts at bottle-feeding and refused to feed, was tube-fed. Another RL lamb presented an apparent life-threatening event following simulated laryngopharyngeal refluxes and required manual stimulation and nasal administration of oxygen for a few minutes. Finally, a third RL lamb developed a recurrent neck extension with writhing movements of the limbs and an arched back following laryngopharyngeal refluxes (Sandifer syndrome). Overall, though variability was present within each group, the RL group presented more swallowing activities, coughing and agitation than the Control group at the time of simulated laryngopharyngeal refluxes. Mean weight gain was  $190 \pm 18$  g per day for the Control group and  $99 \pm 67$  g per day for the RL group ( $p = 0.05$ ).

### ***Macroscopic assessment***

Macroscopic assessment of the larynx revealed the presence of ulcerations on the epiglottis and vocal cords in half of the RL group, compared to no such presence in any of the control lambs. The presence of erythema on the posterior aspect of the vocal cords and edema was also noted in lambs in the RL group.

### ***Histological scoring of laryngeal inflammation***

Histological scoring of laryngeal inflammation was performed on 5 larynges in the RL group and 3 in the Control group (technical problems did not allow assessment of all larynges). Based upon

histological criteria, a moderate laryngeal inflammation was induced in the RL group when compared to the Control group ( $4/15 \pm 2/15$  vs.  $0/15 \pm 1/15$ ).

### ***Baseline parameters***

Baseline parameter values obtained in each group are detailed in Table 1.

**Table 1: Influence of simulated reflux laryngitis on baseline cardiorespiratory values**

<b>Baseline values</b>	<b>Control group</b>	<b>Laryngitis group</b>
Heart rate (beats/min)	180 (23)	183 (30)
Respiratory rate (breaths/min)	47 (10)	<b>41 (16)*</b>
Mean arterial pressure (mmHg)	73 (9)	75 (8)
Hemoglobin O <sub>2</sub> saturation (%)	97 (3)	97 (2)

Values are expressed as mean (standard deviation). \*:  $p < 0.05$  compared to Control group. All other  $p$  values are greater than 0.1

Compared with the Control group, lambs in the RL group presented a lower baseline respiratory rate ( $41 \pm 16$  vs.  $47 \pm 10 \text{ min}^{-1}$ ,  $p < 0.0001$ ). No other significant differences were observed between Control and RL groups for baseline parameters.

### **Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoréflexes**

Results obtained during laryngeal chemoreflexes (LCR) are summarized in Table 2 and detailed in Tables 3, 4 and 5, including significant interactions.

**Table 2: Overall effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes**

	Control group	Laryngitis group	P values
% decrease HR	36 (17)	34 (19)	0.8
Nb. of bradycardias	2 (4)	1 (3)	0.9
Bradycardia duration (s)	1 (2)	1 (3)	0.9
% increase MAP	19 (8)	<b>25 (12)*</b>	0.01
Maximum MAP (mmHg)	87 (11)	94 (13)	0.2
% decrease RR	62 (17)	<b>65 (19)†</b>	0.08
Minimal RR (min <sup>-1</sup> )	17 (7)	<b>13 (7)*</b>	0.002
Apnea duration (s)	5 (4)	<b>9 (9)*</b>	0.01
Respiratory LCR duration	10 (9)	19 (16)	0.3
% decrease SpO <sub>2</sub>	3 (3)	<b>6 (8)*</b>	0.04
Minimum saturation (%)	94 (4)	<b>91 (8)*</b>	0.05
Nb. of swallows	12 (9)	16 (12)	0.8
Total duration of laryngeal closure (s)	0.3 (0.9)	<b>1.4 (2.6)†</b>	0.08
Nb. of coughs	0.5 (1.4)	<b>1.4 (3.0)†</b>	0.1
Arousal (yes/no)	80/12	68/12	0.8
Awakening (yes/no)	49/43	34/46	0.4

Quantitative variables are expressed as mean (SD) and qualitative variables (arousal and awakening) are expressed as relative frequency, with both sleep states and solution types taken together, for each group. Abbreviations: HR, heart rate; nb, number; MAP, mean arterial pressure; RR, respiratory rate; SpO<sub>2</sub>, hemoglobin O<sub>2</sub> saturation. \* : p < 0.05; † : p < 0.1.



**Table 3: Influence of type of solution on the effects of simulated reflux laryngitis on the cardiorespiratory components of laryngeal chemoreflexes.**

	Saline	H2O	HCl	Milk
% decrease HR				
Control	33 (17)	36.5 (17.5)	36 (16.5)	59 (17.5)
Laryngitis	28.5 (19)	32 (16.5)	41 (17.5)	36 (21)
Nb. of bradycardias				
Control	1 (2)	2 (3.5)	1.5 (2)	3 (5)
Laryngitis	0.5 (1)	1 (1.5)	2.5 (4)	1.5 (2.5)
Bradycardia duration (s)				
Control	0.5 (1)	1 (2)	1 (1.5)	1.5 (2.5)
Laryngitis	0.5 (1)	0.5 (1)	2 (3)	2 (4)
% increase MAP				
Control	15.5 (9)	18.5 (7.5)	19.5 (6)	22 (10)
Laryngitis	20 (10.5)	23.5 (10.5)	29 (13.5)	28 (11.5)
% decrease RR				
Control	56 (23.5)	68.5 (8.5)	63 (14.5)	59 (17.5)
Laryngitis	54 (21)	70.5 (14.5)	72 (15.5)	64.5 (18)
Minimum RR (min <sup>-1</sup> )				
Control	19 (9)	14.5 (3.5)	16 (5.5)	18 (7.5)
Laryngitis	18 (8.5)	10.5 (3.5)	10 (5)	13 (5.5)
Apnea duration (s)				
Control	4.5 (4.5)	5 (2)	6 (6)	4 (4)
Laryngitis	4.5 (6.5)	9.5 (6.5)	14.5 (13) *	6.5 (6)
% decrease SpO <sub>2</sub>				
Control	2 (2)	2.5 (2)	4.5 (4.5)	2.5 (3)
Laryngitis	4 (4.5)	4.5 (3.5)	10 (10.5)	7 (8.5)

Data are pooled from quiet and active sleep.

\* :  $p < 0.05$  and † :  $p < 0.1$  RL vs. Control. All other p values are greater than 0.1. See table 2 for abbreviations.

**Table 4: Influence of sleep state and type of solution on the effects of simulated reflux laryngitis on the cardiorespiratory components of laryngeal chemoreflexes**

	Quiet sleep				Active sleep			
	Saline	H <sub>2</sub> O	HCl	Milk	Saline	H <sub>2</sub> O	HCl	Milk
% decrease HR								
Control	31 (19)	40 (17)	36 (16)	38 (19)	35 (15)	33 (18)	36 (18)	37 (14)
Laryngitis	25 (16)	33 (20)	44 (19)	36 (21)	35 (22)	30 (11)	37 (15)	36 (23)
Nb. of bradycardias								
Control	1 (2)	2 (4)	2 (2)	4 (7)	1 (2)	2 (4)	2 (2)	2 (1)
Laryngitis	1 (1)	1 (1)	3 (5)	1 (2)	1 (1)	1 (2)	2 (3)	1 (3)
Bradycardia duration (s)								
Control	1 (1)	1 (2)	1 (1)	3 (4)	1 (1)	1 (2)	1 (2)	1 (1)
Laryngitis	1 (1)	1 (1)	2 (4)	3 (5)	0.4 (0.4)	1 (1)	2 (2)	1 (3)
% increase MAP								
Control	12 (3)	20 (6)	20 (7)	18 (20)	18 (11)	17 (9)	20 (6)	24 (12)
Laryngitis	19 (9)	20 (9)	31 (14)	27 (15)	21 (13)	30 (14)	26 (14)	29 (5)
% decrease RR								
Control	56 (28)	67 (11)	65 (15)	51 (20)	57 (19)	69 (7)	61 (15)	66 (12)
Laryngitis	55 (21)	<b>69 (18)*</b>	<b>69 (15)*</b>	<b>62 (16)*</b>	52 (22)	<b>73 (9)*</b>	<b>76 (17)*</b>	68 (21)
Minimum RR (min <sup>-1</sup> )								
Control	18 (10)	14 (4)	15 (6)	21 (8)	20 (8)	15 (3)	17 (5)	15 (7)
Laryngitis	16 (7)	<b>9 (4)*</b>	<b>11 (5)*</b>	<b>14 (6)*</b>	22 (9)	<b>12 (2)*</b>	<b>9 (5)*</b>	12 (6)
Apnea duration (s)								
Control	5 (5)	6 (3)	7 (7)	2 (3)	4 (4)	5 (1)	4 (3)	5 (5)
Laryngitis	5 (6)	10 (7)	12 (8)	5 (4)	4 (7)	10 (7)	19 (28)	8 (8)
% decrease SpO <sub>2</sub>								
Control	2 (2)	3 (2)	6 (4)	3 (4)	2 (2)	2 (3)	3 (5)	2 (2)
Laryngitis	4 (5)	4 (2)	10 (8)	<b>6 (6)*</b>	4 (3)	<b>6 (5)*</b>	10 (14)	<b>9 (10)<sup>†</sup></b>

\* :  $p < 0.05$  and <sup>†</sup> :  $p < 0.1$  RL vs. Control. All other  $p$  values are greater than 0.1. See table 2 for abbreviations.

**Table 5: Influence of sleep state and type of solution on the effects of simulated reflux laryngitis on the non-cardiorespiratory components of laryngeal chemoreflexes**

	Quiet sleep				Active sleep			
	Saline	H <sub>2</sub> O	HCl	Milk	Saline	H <sub>2</sub> O	HCl	Milk
Nb. of swallows								
Control	6 (2)	13 (6)	21 (15)	11 (4)	6 (1)	10 (3)	17 (11)	12 (6)
Laryngitis	9 (6)	12 (3)	32 (17)	14 (5)	7 (2)	13 (7)	25 (12)	17 (9)
Total duration of laryngeal closure (s)								
Control	0 (0)	0 (0)	0.5 (1.4)	0.4 (1.0)	0.5 (1.0)	0 (0)	0.4 (1.0)	1 (1)
Laryngitis	1 (2)	0.7 (1.6)	1.6 (2.8)	1 (2)	0.4 (0.9)	2 (3)	2 (3)	3 (4)
Nb. of coughs								
Control	0 (1)	0 (1)	2 (3)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
Laryngitis	1 (2)	1 (2)	4 (5)	1 (2)	0 (0)	1 (2)	2 (3)	1 (2)
Arousal (yes/no)								
Control	8/3	10/2	11/1	11/1	11/1	8/3	11/1	11/1
Laryngitis	10/2	10/1	11/1	11/1	5/3	7/2	8/0	7/2
Awakening (yes/no)								
Control	2/10	2/10	9/3	4/8	9/3	6/5	8/4	8/4
Laryngitis	3/9	3/7	6/6	4/8	3/5	3/6	7/1	5/4

All values of p are greater than 0.1. See table 2 for abbreviations.

Overall, LCR elicited a significantly greater respiratory inhibition in the RL group compared to the Control group (all solutions and both sleep states taken together). This respiratory inhibition included a greater % decrease in RR, longer apnea duration, lower minimum respiratory rate and a more prominent decrease in SpO<sub>2</sub> following LCR stimulation. In addition, apneas longer than 10 and 20 sec, as well as decreases in SpO<sub>2</sub> greater than 10%, were more frequent in the RL group. Severe respiratory events were observed in one RL lamb during LCR, with intense swallowing and glottal narrowing-related hypoventilation leading to a marked decrease in SpO<sub>2</sub> down to 64% after milk and 54% after HCl (figure 1).

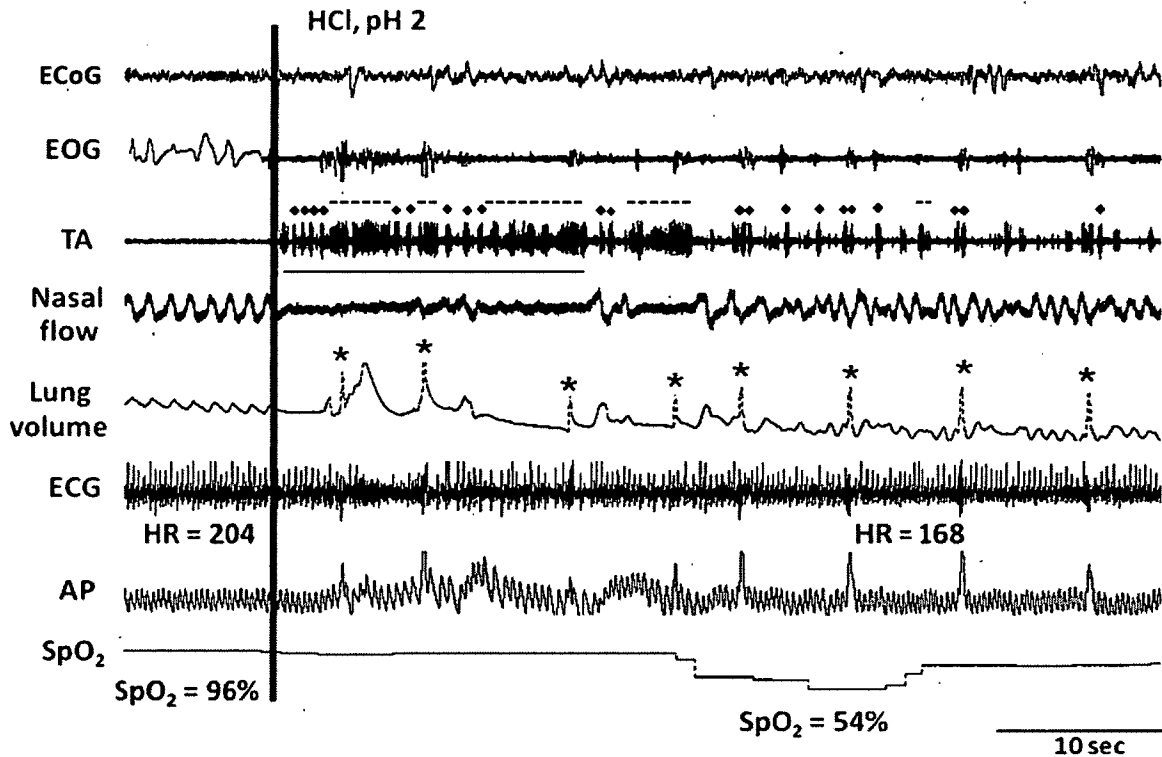


Figure 1. Laryngeal chemoreflexes triggered by HCl on postnatal day 9 in a lamb with simulated reflux laryngitis during active sleep. ECoG, electrocorticogram; EOG, electrooculogram; TA, electrical activity of the thyroarytenoid muscle (a glottal constrictor muscle); nasal flow, nasal airflow; lung volume, sum signal of the respiratory inductance plethysmograph, allowing qualitative measurement of respiration (inspiration upward); ECG, electrocardiogram; HR, heart rate (beats/min); AP, arterial pressure; SpO<sub>2</sub>, oxygen hemoglobin saturation measured by pulse oximetry; ★ = cough, □ = swallow, dashed horizontal lines = laryngeal closure/narrowing. The continuous bar shows a severe hypopnea developing simultaneously to multiple swallows, bouts of laryngeal closure/narrowing and a few coughs (note that the lamb inspires through the mouth for coughing, which explains the “absence” of inspiration on the nasal flow).

While no overall significant differences were observed for cardiac parameters, including % of decrease in HR and bradycardia duration, the % of increase in mean arterial pressure was higher in the RL group than in the Control group. Finally, while no differences between groups were observed for arousal or awakening, a greater number of coughs and total duration of laryngeal closure, denoting enhanced lower airway protective mechanisms, was observed in the RL group. Regardless of the solution tested, no statistical interaction between group and sleep state was observed, indicating an absence of a sleep state effect on the differences between RL and Control groups.

On the contrary, a significant interaction was observed between the type of solution and group of lambs, indicating that the difference between groups was not identical for all solutions. In fact, closer analysis of the results showed that HCl was the only solution to trigger longer apnea duration in the RL as opposed to the Control group (Table 3) (respectively  $14.5 \pm 13$  vs.  $6 \pm 6$  s,  $p = 0.0008$ , pooled data from active and quiet sleep). In addition, HCl triggered 7 of the 10 apneas longer than 20 seconds observed in the RL group. No other statistical interactions were observed between group and solution.

Finally, several significant interactions between group, sleep state and type of solution were observed, including for minimal RR, % decrease in RR and % decrease in  $SpO_2$  (see Table 4 for details). Overall, those interactions suggest that the effects of RL can be observed with any solution but saline, and independent of the sleep state.

## DISCUSSION

The present study provides novel findings on laryngeal chemoreflexes in a new, non-sedated newborn lamb model of simulated reflux laryngitis, which was developed for the purpose of the study. The relevance of this model is shown by clinical and/or histological signs of reflux laryngitis presented by all lambs. Overall, our findings reveal that the presence of reflux laryngitis in newborn lambs enhances the respiratory inhibition observed during laryngeal chemoreflexes.

### **Our ovine neonatal model of simulated reflux laryngitis**

An extensive review of the literature revealed that there are only a few animal models of RL. And while a total of 6 RL models have been described in adult rabbits, dogs or rats, no neonatal model, to our knowledge, has been previously described. In addition, most of these models were specifically designed to characterize the inflammation involved in subglottic stenosis on a traumatized larynx. (1,4,12,25). Only 2 models were designed to study an untraumatized larynx in mildly sedated adult rabbits or non-sedated adult rats (2,18). In contrast, our model was designed to closely reproduce clinical conditions, by posterior laryngopharyngeal instillations of a gastric juice surrogate (pepsin + HCl) in non-sedated newborn lambs. Parameters of our RL model were particularly chosen in order to reproduce what is observed in the neonatal period. A previous study showed that preterm infants are able to maintain an acidified gastric pH < 2, even at 24 weeks of gestational age (10). In addition, a recent study demonstrated that acidified gastric refluxes occur between feedings and, on average, represent 25% of all gastro-esophageal refluxes observed per day in healthy preterm infants (17). Our acidified pepsin solution was chosen to be representative of the gastric content of term newborns of 1-2 months (Michel Armand, personal communication, Marseille, France).

Our neonatal ovine model accurately mimics clinical findings in RL, including cough, weak bleat and reduction in weight gain when compared to the Control group. Such subacute clinical manifestations were not reported in any of the previous studies cited, except for the presence of a biphasic stridor on exertion in rabbits with untraumatized larynx (18). While variable among lambs, simulated laryngopharyngeal refluxes with the gastric juice surrogate induced greater reactions in the RL group than in the Control group, even leading to an ALTE in one lamb. This

lamb presented considerable clinical manifestations of RL, including unwillingness to feed. A previous study also showed that the response to simulated reflux was variable among individuals and also led to an ALTE in one adult animal (18). Our observations are consistent with the fact that, while laryngopharyngeal refluxes are present in virtually all infants, chronic consequences are very variable and only 1-2% will ultimately present with an ALTE (5). Further studies are hence needed in order to understand these individual variations and predispositions to an ALTE, which do not appear solely related to the degree of RL.

#### **Effect of simulated reflux laryngitis on neonatal laryngeal chemoreflexes**

The present study confirms that RL influences neonatal LCR. More specifically, RL enhanced the respiratory inhibition observed during LCR, including longer apnea duration, lower minimum respiratory rate and a more prominent decrease in SpO<sub>2</sub>. Though this respiratory inhibition was most often moderate, severe respiratory events were observed in three RL lambs, which also presented with important clinical manifestations. On the other hand, RL did not appear to enhance cardiac inhibition following LCR. Interestingly, a previous study in newborn lambs infected with the respiratory syncytial virus (16) showed an enhanced respiratory inhibition following LCR compared to controls, but no changes in cardiac parameters. Moreover, our recent study in full-term lambs exposed to cigarette smoke for the first 14 postnatal days showed a somewhat more significant respiratory than cardiac inhibition during LCR (29). However, other studies in lambs have shown that conditions, such as postnatal nicotine injection (30) and prematurity (28), can enhance both respiratory and cardiac inhibition during LCR. Providing a clear explanation for the different effects on the cardiac and respiratory components of the LCR in various conditions is not straightforward. Various mechanisms can be at play with regards to respiration and cardiac inhibition during LCR in lambs. For instance, while control of cardiac activity during LCR involves some level of sympatho-vagal co-activation (3), respiratory inhibition can in part be driven by the reciprocal inhibition brought about by intense swallowing activity (present results and 28). In fact, cardiac and respiratory activity during LCR likely results from a complex interaction of various mechanisms, which may depend on the offending condition. Conceivably, the latter, e.g. cigarette smoke exposure, RL, nicotine or prematurity, can variably alter the function of one or several components of the LCR loop, giving rise to variable consequences on cardiorespiratory components of the LCR. Reflux laryngitis has been

shown to be associated with the production of reactive oxygen species, which induce the cell release of ATP. By activating P2X purinoceptors, the latter would in turn lead to sensitization of capsaicin-sensitive laryngeal afferent fibers and increase respiratory inhibition during larynx stimulation by ammonia (31). In addition, one intriguing hypothesis stems from the association between upper airway inflammation and increased cytokines in the brainstem, which in turn could enhance LCR-linked respiratory inhibition (15,32). Interestingly, increased cytokines in the brainstem have been reported in SIDS victims, compared to controls (8).

Aside from cardiorespiratory responses, our present study in full-term lambs did not reveal any alteration in swallowing activity or arousal in the RL group, whereas enhanced laryngeal closure and coughing were observed, all of which are important responses for liquid clearance from the laryngeal mucosa and prevention of tracheal aspiration. Previous observation of the blunting effect of premature birth on these airway protective mechanisms during LCR (28) suggests that the respiratory consequences of RL are likely worse in preterm neonates, as reported in infants (32).

#### **Influence of sleep states and the type of solution used to induce laryngeal chemoreflexes**

In the present study, no systematic effects of sleep states on LCR-related cardio-respiratory events were observed. While such results may seem at variance with one study in lambs infected with respiratory syncytial virus (16), they are in agreement with other results obtained in preterm as well as in full-term lambs under various experimental conditions (19,28,29).

In contrast, a systematic effect of HCl was observed herein, irrespective of the sleep state, such that longer apnea duration in the RL group was specifically observed with HCl-triggered LCR. The fact that this was not the case in our previous studies (27-29) suggests that the apneic effect of HCl is specifically enhanced in the presence of RL. While this intriguing possibility requires further confirmation, it may be hypothesized that repeated exposure to HCl and/or pepsin during the 6 preceding days led to a specific sensitization of the laryngeal chemoreceptors, such as the C fiber endings, as reported above (26,31).



### **Clinical implications**

Our results add further support to the suggestion that acid laryngopharyngeal refluxes can trigger clinically significant cardiorespiratory events in infants, up to an ALTE. In addition, enhancement of LCR-linked respiratory inhibition, especially by an acid solution, in the presence of RL, supports the involvement of laryngitis in certain cardiorespiratory events of preterm infants (33), and maybe in some SIDS cases. However, it must be recognized that most ALTE and SIDS victims do not have a previous history suggestive of reflux laryngitis. As well, histological findings of reflux laryngitis are not usually found in SIDS victims. Further studies combining the present RL model with our previous models of preterm lambs and/or lambs exposed to cigarette smoke are needed to better understand the potential relevance of RL in the pathophysiology of apneas of prematurity, ALTE and SIDS.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Jean-Philippe Gagné. The study was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and the Foundation of Stars (Quebec) allocated to J-P Praud. A-M Carreau was a MD-MSc scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). Jean-Paul Praud is a member of the FRSQ-funded Clinical Research Center Étienne-Le Bel, Sherbrooke University Hospital, and the holder of the Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology.

## **REFERENCES**

1. **Adhami T, Goldblum JR, Richter JE, Vaezi MF.** The role of gastric and duodenal agents in laryngeal injury: an experimental canine model. *Am J Gastroenterol* 11: 2098-2106, 2004.
2. **Asaoka D, Nagahara A, Oguro M, Mori H, Nakae K, Izumi Y, Osada T, Hojo M, Otaka M, Watanabe S.** Establishment of a reflux esophago-laryngitis model in rats. *Dig Dis Sci* 2010 Oct 9. [Epub ahead of print]
3. **Beuchée A, Nsegbe E, St Hilaire M, Carrault G, Branger B, Pladys P, Praud J-P.** Prolonged dynamic changes in autonomic heart rate modulation induced by acid laryngeal stimulation in non-sedated lambs. *Neonatology* 91: 83-91, 2007.
4. **Carron JD, Greinwald JH, Oberman JP, Werner AL, Derkay CS.** Simulated reflux and laryngotracheal reconstruction: A rabbit model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 576-580, 2001.
5. **Edner A, Wennborg M, Alm B, Lagercrantz H.** Why do ALTE infants not die in SIDS? *Acta Paediatr* 96: 2: 191-194, 2007.
6. **Fortier PH, Reix P, Arsenault J, Dorion D, Praud J-P.** Active upper airway closure during induced central apneas in lambs is complete at the laryngeal level only. *J Appl Physiol* 95: 97-103, 2003.
7. **Goto K, Mirmiran M, Adams MM, Longford RV, Baldwin RB, Boeddiker MA, Ariagno RL.** More awakening and heart rate variability during supine sleep in preterm infants. *Pediatrics* 103: 603-609, 1999.
8. **Kadhim H, Deltenre P, De Prez C, Sébire G.** Interleukin-2 as a neuromodulator possibly implicated in the physiopathology of sudden infant death syndrome. *Neurosci Lett* 480:122-126, 2010.
9. **Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, Kahn A.** Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1298-1303, 2003.
10. **Kelly EJ, Newell SJ, Brownlee KG, Primrose JN, Dear PR.** Gastric acid secretion in preterm infants. *Early Hum Dev* 35: 215-220, 1993.
11. **Kinney HC, Thach BT.** The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361: 795-805, 2009.
12. **Koufman JA.** The otolaryngologic manifestation of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hours pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope* 101: 1-78, 1991.

13. **Leiter JC, Böhm I.** Mechanisms of pathogenesis in the sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 127-138, 2007.
14. **Létourneau P, Dumont S, Kianicka I, Diaz V, Dorion D, Drolet R and Praud J-P.** Radiotelemetry system for apnea study in lambs. *Respir Physiol* 116: 85-93, 1999.
15. **Lindgren C, Grögaard J.** Reflex apnoea response and inflammatory mediators in infants with respiratory tract infection. *Acta Paediatr* 85: 798-803, 1996.
16. **Lindgren C, Lin J, Graham BS, Gray ME, Parker RA, Sundell HW.** Respiratory syncytial virus infection enhances the response to laryngeal chemostimulation and inhibits arousal from sleep in young lambs. *Acta Paediatr* 85: 789-797, 1996.
17. **Lopez-Alonso M, Moya MJ, Cabo JA, Ribas J, del Carmen Macias M, Silny J, Sifrim D.** Twenty-four-hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: Rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 118: e299-308, 2006.
18. **Ludemann JP, Manoukian J, Shaw K, Bernard C, Davis M, al-Jubab A.** Effects of simulated gastroesophageal reflux on the untraumatized rabbit larynx. *J Otolaryngol* 27: 127-131, 1998.
19. **Marchal F, Corke BC, Sundell H.** Reflex apnea from laryngeal chemo-stimulation in the sleeping premature newborn lamb. *Pediatr Res* 16: 621-627, 1982.
20. **Praud J-P.** Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr Respir Rev* 11: 208-212, 2010.
21. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Létourneau P, Praud J-P.** Non-nutritive swallowing and respiration coordination in full-term newborn lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 134: 209-218, 2003.
22. **Reix P, St-Hilaire M, Praud J-P.** Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr Pulmonol* 42: 674-682, 2007.
23. **Renolleau S, Létourneau P, Niyonsenga T, Praud J-P.** Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1396-1404, 1999.
24. **Roh JL, Lee YW, Park HT.** Effect of acid, pepsin, and bile acid on the stenotic progression of traumatized subglottis. *Am J Gastroenterol* 101: 1186-1192, 2006.
25. **Roh JL, Yoon YH.** Effect of acid and pepsin on glottic wound healing: A simulated reflux model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 995-1000, 2006.
26. **Roulier S, Arsenault J, Reix P, Dorion D, Praud J-P.** Effects of C fiber blockade on cardiorespiratory responses to laryngeal stimulation in conscious lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 136: 13-23, 2003.

27. **St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, Praud J-P.** Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in nonsedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* 98: 2197-2203, 2005.
28. **St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareille C, Moreau-Bussiere F, Micheau P, Lebon J, Praud J-P.** Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102: 1429-1438, 2007.
29. **St-Hilaire M, Duvareille C, Avoine O, Carreau AM, Samson N, Micheau P, Douiek A, Praud J-P.** Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol* 10: 1820-1826, 2010.
30. **Sundell HW, Karmo H, Milerad J.** Impaired cardiorespiratory recovery after laryngeal stimulation in nicotine-exposed young lambs. *Pediatr Res* 53: 104-112, 2003.
31. **Tsai TL, Chang SY, Ho CY, Kou YR.** Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats. *J Appl Physiol* 106: 1584-1592, 2009.
32. **Thach BT.** Laryngeal chemoreflexes and development. *Paediatr Respir Rev* 11: 213-218, 2010.
33. **Vermeulen D, Franco P, Hennequin Y, Pardou A, Brugmans M, Simon P, Hassid S.** Laryngeal oedema in neonatal apnoea and bradycardia syndrome (a pilot study). *Early Hum Dev* 81: 361-367,

## **Chapitre IV. Discussion**

### **1. Modèle de laryngite de reflux**

Tout d'abord, cette étude a permis de mettre au point le premier modèle néonatal de LR subaiguë présentant les caractéristiques cliniques et histologiques spécifiques de cette entité clinique. En effet, les modèles présentés dans la littérature, jusqu'à présent, n'avaient pas été conçus de manière à répondre à notre question de recherche (Koufman 1991; Ludemann et al. 1998; Carron et al. 2001; Adhami et al. 2004; Roh et al. 2006a; Roh et al. 2006b). Nous avons donc élaboré un modèle qui correspondait aux caractéristiques spécifiques du reflux gastrique du nouveau-né, de manière à mimer avec le plus de réalisme possible ce qui est retrouvé en clinique. Bien que peu de données fussent disponibles dans la littérature concernant les données physiologiques des RLP des nouveau-nés ou des prématurés, nous avons appuyé chacune des composantes de notre modèle par des données de la littérature. De cette manière, le pH de la solution utilisée, la concentration de pepsine, la fréquence des reflux et leur volume reposent tous sur la physiologie connue du nouveau-né humain.

Contrairement aux autres modèles de la littérature, notre modèle est aussi le premier conçu pour étudier l'impact de la LR sur une autre pathologie que l'inflammation laryngée elle-même.

#### **1.1 Clinique**

Notre modèle de LR est le premier à présenter des signes cliniques chroniques de la LR, soit une raucité de la voix même jusqu'à l'extinction complète chez certains agneaux, de la toux chronique, une diminution de la prise de poids et parfois un refus de s'alimenter.

Nous avons aussi pu remarquer des réactions importantes lors de la simulation du reflux (injection de HCl et de pepsine pendant 6 jours), qui semblaient progresser avec les instillations répétées. De manière plutôt constante, les agneaux du groupe LR présentaient de la toux et des déglutitions répétées qui augmentaient progressivement avec le nombre

cumulatif d'instillations. Nous avons même pu remarquer à quelques reprises des épisodes de « posturing », où l'agneau présentait un dos arqué et le cou en hyperextension, avec le maintien de cette position pour plusieurs secondes suite à l'injection de la solution d'HCl et de pepsine. De manière intéressante, ce type de « posturing », connu sous le nom de syndrome de Sandifer, est un signe reconnu de RGO pathologique chez le nouveau-né. De plus, nous avons même objectivé une réaction sévère, s'apparentant à un ALTE chez un agneau du groupe LR et nécessitant une réanimation avec de l'oxygène. De manière intéressante, un épisode semblable au ALTE avait été observé dans l'étude de Ludemann et al où un des lapins, même s'il ne s'agissait pas d'un nouveau-né, avait présenté une apnée prolongée lors de l'instillation de la solution acidifiée et avait nécessité une réanimation avec de l'oxygénothérapie (Ludemann et al. 1998). De plus, l'équipe d'Adhami et al. a aussi décrit des laryngospasmes sévères chez 3 animaux lors de l'injection, entraînant même un décès (Adhami et al. 2004).

Ceci est en accord avec les hypothèses de la littérature qui attribuent un grand nombre d'ALTE au RLP et vient appuyer d'autant plus ces hypothèses émises chez le nouveau-né humain où il serait difficile de documenter un épisode d'ALTE coïncidant parfaitement avec un épisode de RLP. Il s'agit, à notre connaissance, de la première fois qu'un épisode d'ALTE secondaire à un RLP constitué d'HCl et de pepsine à concentration et volume semblable à ce qui est retrouvé lors d'un RLP acide d'un nouveau-né humain est rapporté dans la littérature. Étant donné que ce modèle était utilisé pour la première fois lors de cette étude, nous ne nous attendions pas à relever des réactions au reflux simulé aussi sévères. Malheureusement, même si les réactions des animaux étaient notées après chaque reflux simulé (lors des 6 jours d'instillation de pepsine acidifiée, avant les enregistrements polysomnographiques), nous n'avions pas de méthode de recueil standardisé et quantitatif pour nous permettre d'évaluer plus finement ces réactions. À la lumière des observations intéressantes que nous avons faites lors de cette étude, il serait intéressant de développer un système de recueil de ces données beaucoup plus standardisé et systématique, nous permettant de tirer des conclusions et des analyses statistiques sur les réactions aux reflux simulés. Ces réactions sévères sont-elles effectivement plus fréquentes chez les animaux avec une symptomatologie clinique plus importante, une inflammation histologique plus

importante ou chez ceux qui présentent une inhibition respiratoire plus importante aux CRL? Sont-elles plus fréquentes au début des instillations de la solution d'HCl et de pepsine ou à la fin des 6 jours d'instillation lorsque l'inflammation laryngée est installée? Ces questions pertinentes restent en suspens pour le moment et il s'agit certainement d'une piste intéressante à explorer pour mettre en relation ce qui est observé cliniquement chez le nouveau-né humain et notre modèle animal.

Ce recueil de données pourrait être effectué en utilisant le même matériel que lors des enregistrements polysomnographiques aussi, lors des 6 jours de reflux simulés (lors de la création du modèle de laryngite de reflux). Cela nous permettrait d'objectiver la présence de réflexes de protection des VAI (toux, déglutitions, laryngospasme), ainsi que la présence de bradycardies, apnées et désaturations lors de ces reflux. Par contre, pour des raisons techniques ainsi que dû au temps nécessaire à l'instrumentation des animaux, il serait probablement difficile d'effectuer ces enregistrements 3 fois par jour, pendant 6 jours. Nous pourrions, par contre, penser à l'effectuer à 3-4 reprises durant ces 6 jours.

## 1.2 Histopathologie

Bien que les lésions spécifiques histologiques se rattachant à la LR ne soient pas bien documentées, nous avons pu observer chez les agneaux du groupe LR une inflammation modérée. Cette inflammation était plus importante au niveau de l'aspect ventral de l'épiglotte, où nous retrouvons la plupart des ulcérations profondes visibles macroscopiquement, ainsi qu'au niveau des cartilages aryténoïdes postérieurs. Il s'agit donc de la distribution postérieure typique de l'inflammation laryngée secondaire au reflux. Il s'agit aussi de la distribution physiologique des chémorécepteurs laryngés (Reix et al. 2007) et des régions anatomiques où l'innervation sensitive est la plus importante (Sasaki et al. 1997), ce qui est justifié physiologiquement par la distribution anatomique la plus susceptible d'être en contact avec les stimuli potentiellement dangereux pour les VAI. Nous pouvons nous questionner sur la possibilité qu'une inflammation de ces régions spécifiques riches en chémorécepteurs laryngés entraîne une perturbation des CRL plus importante qu'une inflammation laryngée diffuse comme c'est le cas en présence d'exposition à la fumée de cigarette ou au virus respiratoire syncytial. Jusqu'à présent, les études de notre



laboratoire n'ont pas été conduites de manière à comparer les différents modèles, mais l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une perturbation de la composante respiratoire des CRL qui semble être semblable à celle observée dans le modèle de LR, incluant des événements sévères avec désaturation en oxygène tel qu'observé dans la présente étude (St-Hilaire et al. 2010). Par contre, la présence de mécanismes de protection des VAI exagérés (augmentation de la toux et de la fermeture laryngée suite au CRL) chez les agneaux du groupe LR, qui n'a pas été retrouvée dans le modèle d'agneaux exposés à la fumée de cigarette (St-Hilaire et al. 2010), pourrait potentiellement être en lien avec la distribution de l'inflammation laryngée. Une comparaison des trouvailles histologiques chez les 2 modèles pourrait donc s'avérer intéressante. De plus, ce modèle de LR pourrait nous aider à préciser nos connaissances histopathologiques spécifiques à la laryngite causée par le RLP.

Par ailleurs, un aspect érythémateux macroscopiquement de la muqueuse trachéale et de l'inflammation histologique ont été identifiés au niveau de la trachée chez certains agneaux, ce qui nous laisse suspecter une aspiration au niveau des VAI du RLP. Il serait donc intéressant de développer une technique fiable nous permettant d'identifier la présence d'aspiration trachéale chez notre modèle de LR.

## **2. Effets de la laryngite de reflux sur les chémoréflexes laryngés**

Lors de cette étude, nous avons pu observer les effets de la LR sur les CRL. Nous avons démontré que la LR entraîne une inhibition respiratoire plus importante suite aux CRL que chez les Contrôles, sans inhibition de la composante cardio-vasculaire des CRL, tout en entraînant une augmentation des mécanismes de protection des VAI.

Tel que discuté dans l'article présenté, ce patron particulier d'inhibition respiratoire, sans inhibition cardio-vasculaire a aussi été démontré chez le modèle d'exposition postnatal à la fumée de cigarette développé par notre laboratoire (St-Hilaire et al. 2010) et chez l'agneau nouveau-né exposé au virus respiratoire syncytial (Lindgren et al. 1996b). Cela est contraire à ce qui a été démontré dans le modèle de nouveau-né prématuré qui présente, en plus d'une inhibition respiratoire suite aux CRL, une inhibition cardio-vasculaire importante (St-Hilaire et al. 2007). L'exposition post-natale à une condition surajoutée chez

un individu ayant une maturation neurologique « normale » semble être le point commun des conditions entraînant une inhibition respiratoire prépondérante suite aux CRL, sans atteinte de la composante cardio-vasculaire. De plus, l'inflammation laryngée est une caractéristique commune à ces 3 pathologies. Il a été démontré que l'inflammation périphérique pouvait engendrer une inflammation centrale via les cytokines inflammatoires, transportées via les connexions axonales de manière rétrograde ou de manière hématogène (Thach 2010). L'injection intraveineuse d'interleukine 1 $\beta$  a augmenté significativement la composante apnéique des CRL chez des cochonnets, et a ainsi modifié la capacité d'auto-réanimation. (Stoltenberg et al. 1994; Froen et al. 2000). De cette manière, il est possible que l'inflammation laryngée entraîne une inflammation des centres de contrôle respiratoire au niveau du tronc cérébral. Jusqu'à présent, aucune étude ne s'est intéressée à l'inflammation centrale causée par la laryngite de reflux. Bien que nous n'ayons pas analysé cette composante jusqu'à présent, nous avons conservé les troncs cérébraux des agneaux utilisés lors de cette étude de manière à analyser les marqueurs inflammatoires présents.

### **3. Pertinence clinique de l'étude**

La présente étude permet d'ajouter des connaissances intéressantes pour notre compréhension des mécanismes sous-jacents aux apnées-bradycardies du nouveau-né ainsi qu'aux ALTE et au SMSN.

Étant donné l'absence de littérature, jusqu'à présent, sur les conséquences cliniques possibles d'une LR chez le nouveau-né, les données recueillies lors de cette étude pourront alimenter la recherche clinique chez le nouveau-né humain. En effet, cette étude vient porter une attention particulière sur la possibilité que la LR puisse exacerber les CRL chez des nouveau-nés apparemment sains et supporte la possibilité que cette entité clinique soit liée à certains cas d'ALTE ou de SMSN. De manière intéressante, nous avons pu observer un sous-groupe d'animaux qui présentaient des réactions cardio-respiratoires inhibitrices particulièrement exagérées suite aux CRL, ce qui pourrait aussi constituer une situation réelle en clinique. Effectivement, même si la très grande majorité des nouveau-nés atteints de LR ne présenteront aucun problème lié aux apnées-bradycardie, cette étude nous invite à

identifier pourquoi certains individus présenteront des réactions sévères et potentiellement mortelles.

En considérant les effets démontrés dans cette étude de la LR sur les CRL, nous pouvons croire, tout d'abord, qu'une recherche plus systématique des signes cliniques de LR chez les nouveau-nés et que la mise en place d'une démarche diagnostique adaptée aux nouveau-nés pourrait avoir un certain intérêt en clinique. Suite aux résultats de cette étude, il sera aussi intéressant de questionner la nécessité d'un traitement plus précoce de la LR, surtout chez les nouveau-nés présentant plusieurs facteurs de risques pour des problématiques du contrôle respiratoire (ex. prématurité, exposition à la fumée de cigarette, infections répétées par des virus respiratoires tels le virus respiratoire syncytial). D'ailleurs, l'étude pilote de Vermeulen et al. effectuée en 2005, ayant pour objectif de vérifier l'effet du traitement de la LR sur les apnées-bradycardies-désaturations du prématuré correspond exactement aux répercussions cliniques que pourrait suggérer notre étude (Vermeulen et al. 2004). Nous croyons que ces démonstrations sur le plan physiologique chez un modèle animal pourraient encourager la mise en place d'études supplémentaires sur le plan clinique.

#### **4. Limitations de l'étude**

Même si nous avons mis une attention particulière à utiliser les données cliniques du nouveau-né pour mettre au point le modèle de LR, l'extrapolation des résultats obtenus avec ce modèle animal à ce qui se passe dans la réalité clinique doit être faite avec beaucoup de précautions.

Une des limitations majeure de ce modèle est la courte durée d'exposition au reflux simulé par rapport à ce que l'on retrouve en réalité chez le nouveau-né humain. Pour des raisons techniques et dans l'objectif d'étudier les agneaux dans leurs premières semaines de vie, les agneaux ont été exposés à seulement 6 jours de reflux simulés. De plus, l'exposition à 3 reflux acides par jour, pour des raisons techniques, est en deçà du nombre de reflux acides démontrés chez le nouveau-né (médiane de 18 reflux acides par jour) (Lopez-Alonso et al. 2006). Par contre, l'obtention d'une présentation clinique valide et l'étude histologique nous portent à croire que l'inflammation entraînée est suffisante pour correspondre à une

LR modérée, mais que son installation est probablement beaucoup plus rapide que ce qui est observé en clinique.

Par ailleurs, ce modèle est obtenu suite à une instrumentation chirurgicale sous anesthésie générale avec intubation endotrachéale, ce qui entraîne une certaine composante inflammatoire, à la fois centrale et laryngée. Tel que décrit précédemment, il est suggéré dans la littérature que l'inflammation centrale peut contribuer à l'exacerbation de la composante cardio-respiratoire des CRL. Par contre, étant donné que le groupe contrôle a subi exactement les mêmes manipulations chirurgicales, la différence obtenue lors des CRL représente donc l'effet unique de la LR.

Une autre limitation de notre modèle correspond à l'exposition physiologique de l'agneau aux RLP. Bien que classiquement l'orientation de l'estomac perpendiculaire à l'œsophage rende le SIO très étanche au RGO chez les mammifères à quatre pattes (Mansfield 2001), nous avons récemment montré que l'agneau nouveau-né présente des RGO spontanés (Djeddi et al. 2012). Cependant, étant donné qu'aucun de ces RGO spontanés n'est acide, nous pouvons donc supposer que les agneaux nouveau-nés ne sont pas physiologiquement exposés au RLP. Ceci peut amener certains questionnements sur la susceptibilité de la muqueuse laryngée pour une réaction inflammatoire à des stimuli auxquels celle-ci n'est pas en contact habituellement. Cette problématique n'a jamais été soulevée dans la littérature qui utilise aussi des modèles de LR chez des quadrupèdes. Par ailleurs, étant donné la présence de signes cliniques et histologiques se rapprochant de ceux présents chez l'humain, chez le modèle d'agneaux avec LR, nous croyons que la réaction inflammatoire présentée chez les agneaux est semblable à celle retrouvée chez les nouveau-nés humains. De plus, l'absence de RGO acide chez l'agneau nouveau-né est un avantage pour le contrôle des variables du modèle. En effet, les seuls RGO acides présents chez les agneaux sont ceux induits expérimentalement. Nous évitons donc la présence d'agneaux contrôle présentant un RGO acide pathologique de base, par exemple.

De plus, il faut mentionner que cette étude est effectuée chez un nombre restreint d'animaux, qui a cependant été démontré comme statistiquement suffisant pour les expérimentations dans notre laboratoire. Par contre, nous avons pu remarquer une grande

variabilité interindividuelle par rapport aux signes cliniques et à l'inflammation laryngée au niveau histologique, ainsi qu'en réponse aux CRL. Cela entraîne un intérêt sur les manifestations qui pourraient apparaître dans un plus grand groupe d'animaux. Malheureusement, notre étude n'a pas été conçue pour déterminer les différences qui existent entre les animaux du groupe LR présentant des événements très délétères aux CRL (s'approchant de l'ALTE) et les animaux du groupe LR présentant une réaction s'approchant de celles du groupe contrôle. Il aurait été intéressant de regarder les caractéristiques cliniques et histologiques du sous-groupe d'agneaux présentant des réponses très délétères aux CRL. De plus, l'inflammation centrale présente chez ce sous-groupe d'agneaux pourrait éventuellement nous aiguiller sur certaines hypothèses. Il faudrait aussi bien sûr considérer la présence de multiples prédispositions sur le plan génétique potentiellement responsable d'une telle variabilité interindividuelle.

## **5. Perspectives de l'étude**

Le modèle de LR mis au point lors de cette étude servira aussi à étudier les effets de la LR combinée avec d'autres situations cliniques fréquemment rencontrées chez les nouveau-nés. En premier lieu, un modèle de nouveau-nés prématurés mis au point dans notre laboratoire (St-Hilaire et al. 2007) pourra être exposé aux RLP de manière à déterminer si la présence d'une seconde condition reconnue pour entraîner des CRL de type fœtal contribue davantage à l'inhibition cardio-respiratoire engendrée par les CRL. De la même manière, l'exposition d'agneaux nouveau-nés à la fumée de cigarette en post-natal (St-Hilaire et al. 2010) en combinaison avec une LR constitue une situation fréquente chez le nouveau-né qui est susceptible d'engendrer des CRL menant à des réponses délétères.

Nous avons pu démontrer par ce modèle que, bien que le contrôle respiratoire soit altéré suite aux CRL chez le nouveau-né avec laryngite de reflux, mature par ailleurs, le contrôle cardio-vasculaire ne semble pas altéré. Il serait alors intéressant d'évaluer l'effet de la laryngite de reflux sur le gasping hypoxique, ainsi que sur la capacité d'auto-réanimation dans ce contexte.

À l'aide d'un modèle ovin similaire, il serait aussi intéressant d'évaluer les réflexes cardiorespiratoires secondaires à un RGO acide ne remontant pas au-dessus du corps de l'œsophage ou au contraire allant jusqu'à entraîner une aspiration trachéale. L'activation de différents réflexes des voies aériennes inférieures ou provenant de l'œsophage peuvent correspondre à une situation physiologique différente des CRL.

Ce modèle pourra servir à étudier la physiologie laryngée en condition pathologique, que ce soit secondairement à l'inflammation locale produite directement ou à l'inflammation du système nerveux central produite indirectement par l'inflammation laryngée. D'ailleurs, depuis mon étude, ce modèle de LR a été utilisé pour évaluer l'effet de la LR sur les déglutitions non nutritives, une composante essentielle de la protection des voies aériennes inférieures.

## **Chapitre V. Conclusion**

Pour conclure, lors de mes études de maîtrise, j'ai pu mettre au point un modèle de laryngite de reflux valide sur le plan clinique et histologique. Celui-ci a permis d'étudier les effets d'une laryngite de reflux sur les CRL et de démontrer pour la première fois dans la littérature qu'elle entraînait une inhibition respiratoire suite aux CRL, qui peut parfois être sévère et mener à des événements potentiellement délétères. Cette démonstration est d'intérêt et peut être associée à un risque de développer des apnées-bradycardies du sommeil, des ALTE ou un syndrome de mort subite du nourrisson.

## Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier mon directeur de recherche, professeur Jean-Paul Praud pour l'appui inestimable apporté tout au long de mon cheminement menant à la production de ce mémoire de Maîtrise, pour son encadrement et sa présence constante, pour la précieuse méthode de travail et de présentation qu'il m'a transmise que je conserverai tout au long de ma carrière.

Je remercie tous mes collègues, particulièrement Nathalie Samson qui a grandement contribué à la réalisation de l'article et pour sa grande aide dans la réalisation de mon projet.

Je remercie aussi particulièrement Marie St-Hilaire pour sa grande expertise des chémoréflexes laryngés qu'elle a partagée avec passion, sans hésitation, ainsi que pour son aide apportée dès que j'en ai eu besoin.

Merci à Hugues Patural et Jean-Philippe Gagné sans qui ce projet n'aurait pu être réalisable et pour tout le plaisir que nous avons eu à travailler ensemble.

Merci à mes ami(e)s pour l'équilibre qu'ils amènent dans ma vie et leur compréhension. Un grand Merci à ma famille : ma mère Gertrude, mon père Marc et ma sœur Joannie pour les encouragements et le soutien lorsque j'en ai le plus besoin. Et finalement un énorme Merci à mon conjoint Michaël pour être tout simplement la personne qu'il est, pour son appui inconditionnel dans les moments difficiles, pour sa capacité à partager mes bonheurs et pour sa capacité à comprendre, même parfois l'incompréhensible!



## Bibliographie

- Adgent, M. A. (2006). "Environmental tobacco smoke and sudden infant death syndrome: a review." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **77**(1): 69-85.
- Adhami, T., J. R. Goldblum, et al. (2004). "The role of gastric and duodenal agents in laryngeal injury: an experimental canine model." The American Journal of Gastroenterology **99**(11): 2098-2106.
- Alden, E. R., T. Mandelkorn, et al. (1972). "Morbidity and mortality of infants weighing less than 1,000 grams in an intensive care nursery." Pediatrics **50**(1): 40-49.
- Anderson, H. R. and D. G. Cook (1997). "Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence." Thorax **52**(11): 1003-1009.
- Anderson, J. W., F. B. Sant'Ambrogio, et al. (1990). "Water-responsive laryngeal receptors in the dog are not specialized endings." Respir Physiol **79**(1): 33-43.
- Asaoka, D., A. Nagahara, et al. (2011). "Establishment of a reflux esophago-laryngitis model in rats." Dig Dis Sci **56**(5): 1299-1308.
- Bartlett, D., Jr. (1988). Comparative aspects of upper airway structure and function. Respiratory function of the upper airway. Lung biology in health and disease. O. P. Mathew and G. Sant'Ambrogio. New York, Marcel Dekker. **35**: 31-45.
- Boggs, D. F. and D. Bartlett, Jr. (1982). "Chemical specificity of a laryngeal apneic reflex in puppies." J Appl Physiol **53**(2): 455-462.
- Bohm, I., L. Xia, et al. (2007). "GABAergic processes mediate thermal prolongation of the laryngeal reflex apnea in decerebrate piglets." Respir Physiol Neurobiol **156**(2): 229-233.
- Carron, J. D., J. H. Greinwald, et al. (2001). "Simulated reflux and laryngotracheal reconstruction: a rabbit model." Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery **127**(5): 576-580.
- Curran, A. K., L. Xia, et al. (2005). "Elevated body temperature enhances the laryngeal chemoreflex in decerebrate piglets." J Appl Physiol **98**(3): 780-786.
- Davidson, G. P. and T. I. Omari (2001). "Pathophysiological mechanisms of gastroesophageal reflux disease in children." Curr Gastroenterol Rep **3**(3): 257-262.
- Djeddi, D., N. Samson, et al. (2012). "The Newborn Lamb as A New Model For Studying Gastroesophageal Reflux." J Pediatr Gastroenterol Nutr.
- Downing, S. E. and J. C. Lee (1975). "Laryngeal chemosensitivity: a possible mechanism for sudden infant death." Pediatrics **55**: 640.
- Froen, J. F., H. Akre, et al. (2000). "Adverse effects of nicotine and interleukin-1beta on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome." Pediatrics **105**(4): E52.

- Golski, C. A., E. S. Rome, et al. (2010). "Pediatric specialists' beliefs about gastroesophageal reflux disease in premature infants." Pediatrics **125**(1): 96-104.
- Guntheroth, W. G. and P. S. Spiers (2001). "Thermal stress in sudden infant death: Is there an ambiguity with the rebreathing hypothesis?" Pediatrics **107**(4): 693-698.
- Haggitt, R. C. (2000). "Histopathology of reflux-induced esophageal and supraesophageal injuries." Am J Med **108 Suppl 4a**: 109S-111S.
- Hall, K. L. and B. Zalman (2005). "Evaluation and management of apparent life-threatening events in children." Am Fam Physician **71**(12): 2301-2308.
- Hanamori, T. (2001). "Effects of various ion transport inhibitors on the water response in the superior laryngeal nerve in rats." Chem Senses **26**(7): 897-903.
- Harned, H. S., J. Myracle, Jr., et al. (1978). "Respiratory suppression and swallowing from introduction of fluids into the laryngeal region of the lamb." Pediatr Res **12**(10): 1003-1009.
- Heman-Ackah, Y. D., K. J. Pernell, et al. (2009). "The laryngeal chemoreflex: an evaluation of the normoxic response." Laryngoscope **119**(2): 370-379.
- Hunt, C. E. and F. R. Hauck (2006). "Sudden infant death syndrome." CMAJ **174**(13): 1861-1869.
- Jadcherla, S. R., W. J. Hogan, et al. (2010). "Physiology and pathophysiology of glottic reflexes and pulmonary aspiration: from neonates to adults." Semin Respir Crit Care Med **31**(5): 554-560.
- Jakubowska, A. E., G. J. McCrabb, et al. (1996). "Influence of sedation on arousal and cardiorespiratory responses to airflow obstruction in sleeping lambs." Pediatr Res **40**(4): 564-570.
- Johnson P., S. D. M. a. S. A. T. (1975). "Apnoea induced by stimulation of sensory receptors in the larynx. In: J.F. Bosma and J. Showacre, Editors, Symposium on Development of Upper Respiratory Anatomy and Function. Implications for Sudden Infant Death Syndrome." US Department of Health, Education, and Welfare, Washington DC: 160-185.
- Johnston, N., C. W. Wells, et al. (2007). "Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells." Ann Otol Rhinol Laryngol **116**(12): 934-938.
- Koufman, J. A. (1991). "The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury." The Laryngoscope **101**(4 Pt 2 Suppl 53): 1-78.
- Koufman, J. A., J. E. Aviv, et al. (2002). "Laryngopharyngeal reflux: position statement of the committee on speech, voice, and swallowing disorders of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery." Otolaryngol Head Neck Surg **127**(1): 32-35.

- Lanier, B., M. A. Richardson, et al. (1983). "Effect of hypoxia on laryngeal reflex apnea--implications for sudden infant death." Otolaryngol Head Neck Surg **91**(6): 597-604.
- Lee, J. C., B. J. Stoll, et al. (1977). "Properties of the laryngeal chemoreflex in neonatal piglets." Am J Physiol **233**(1): R30-36.
- Leiter, J. C. and I. Bohm (2007). "Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome." Respir.Physiol.Neurobiol.(Journal Article).
- Lindgren, C. and J. Groggaard (1996a). "Reflex apnoea response and inflammatory mediators in infants with respiratory tract infection." Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992) **85**(7): 798-803.
- Lindgren, C., J. Lin, et al. (1996b). "Respiratory syncytial virus infection enhances the response to laryngeal chemostimulation and inhibits arousal from sleep in young lambs." Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992) **85**(7): 789-797.
- Lopez-Alonso, M., M. J. Moya, et al. (2006). "Twenty-four-hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux." Pediatrics **118**(2): e299-308.
- Lucier, G. E., A. T. Storey, et al. (1979). "Effects of upper respiratory tract stimuli on neonatal respiration: reflex and single neuron analyses in the kitten." Biol Neonate **35**(1-2): 82-89.
- Ludemann, J. P., J. Manoukian, et al. (1998). "Effects of simulated gastroesophageal reflux on the untraumatized rabbit larynx." The Journal of otolaryngology **27**(3): 127-131.
- Mansfield, L. E. (2001). "Embryonic origins of the relation of gastroesophageal reflux disease and airway disease." Am J Med **111 Suppl 8A**: 3S-7S.
- Maronian, N., R. Haggitt, et al. (2003). "Histologic features of reflux-attributed laryngeal lesions." Am J Med **115 Suppl 3A**: 105S-108S.
- McGovern, M. C. and M. B. Smith (2004). "Causes of apparent life threatening events in infants: a systematic review." Arch Dis Child **89**(11): 1043-1048.
- McKelvey, G. M., E. J. Post, et al. (2001). "Airway protection following simulated gastroesophageal reflux in sedated and sleeping neonatal piglets during active sleep." Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(7): 533-539.
- Negus, V. E. (1949). "The evolution of the voice of animals and man." Ir J Med Sci(278): 85-89.
- Nelson, E. A., B. J. Taylor, et al. (1989). "Sleeping position and infant bedding may predispose to hyperthermia and the sudden infant death syndrome." Lancet **1**(8631): 199-201.
- Omari, T. (2003). Gastroesophageal Reflux and Related Diseases. Respiratory Control and Disorder in the Newborn. O. P. Mathew. Adelaide, South Australia, Australia, Marcel Dekker Inc. **173**: 473-494.
- Omari, T. I., C. Barnett, et al. (1998). "Mechanisms of gastroesophageal reflux in healthy premature infants." J Pediatr **133**(5): 650-654.

- Omari, T. I., C. P. Barnett, et al. (2002). "Mechanisms of gastro-oesophageal reflux in preterm and term infants with reflux disease." Gut **51**(4): 475-479.
- Ponsonby, A. L., T. Dwyer, et al. (1993). "Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position." N Engl J Med **329**(6): 377-382.
- Ponsonby, A. L., T. Dwyer, et al. (1992). "Sudden infant death syndrome: seasonality and a biphasic model of pathogenesis." J Epidemiol Community Health **46**(1): 33-37.
- Praud, J. P. (2003). "Sudden infant death syndrome: "sleep tight on your back..."...and what else?" Revue des maladies respiratoires **20**(3 Pt 1): 323-326.
- Praud, J. P. (2010). "Upper airway reflexes in response to gastric reflux." Paediatr Respir Rev **11**(4): 208-212.
- Reix, P., M. St-Hilaire, et al. (2007). "Laryngeal sensitivity in the neonatal period: From bench to bedside." Pediatric pulmonology **42**(8): 674-682.
- Roh, J. L., Y. W. Lee, et al. (2006a). "Effect of acid, pepsin, and bile acid on the stenotic progression of traumatized subglottis." The American Journal of Gastroenterology **101**(6): 1186-1192.
- Roh, J. L. and Y. H. Yoon (2006b). "Effect of acid and pepsin on glottic wound healing: a simulated reflux model." Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery **132**(9): 995-1000.
- Rudolph, C. D., L. J. Mazur, et al. (2001). "Guidelines for evaluation and treatment of gastroesophageal reflux in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition." J Pediatr Gastroenterol Nutr **32** Suppl 2: S1-S1.
- Sasaki, C. T. and E. M. Weaver (1997). "Physiology of the larynx." The American Journal of Medicine **103**(5A): 9S-18S.
- St-Hilaire, M., C. Duvareille, et al. (2010). "Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs." J Appl Physiol **109**(6): 1820-1826.
- St-Hilaire, M., E. Nsegbe, et al. (2005). "Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in nonsedated newborn lambs during quiet sleep." Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985) **98**(6): 2197-2203.
- St-Hilaire, M., N. Samson, et al. (2007). "Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb." Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985) **102**(4): 1429-1438.
- Stanton, A. N. (1984). "Sudden infant death. Overheating and cot death." Lancet **2**(8413): 1199-1201.
- Stoltenberg, L., T. Sundar, et al. (1994). "Changes in apnea and autoresuscitation in piglets after intravenous and intrathecal interleukin-1 beta injection." J Perinat Med **22**(5): 421-432.
- Sundell, H. W., H. Karmo, et al. (2003). "Impaired cardiorespiratory recovery after laryngeal stimulation in nicotine-exposed young lambs." Paediatr Res **53**(1): 104-112.

- Sutton, D., E. M. Taylor, et al. (1978). "Prolonged apnea in infant monkeys resulting from stimulation of superior laryngeal nerve." Pediatrics **61**(4): 519-527.
- Tack, J. (2005). "Review article: role of pepsin and bile in gastro-oesophageal reflux disease." Aliment Pharmacol Ther **22 Suppl 1**: 48-54.
- Thach, B. (2010). "Laryngeal chemoreflexes and development." Paediatr Respir Rev **11**(4): 213-218.
- Thach, B. T. (2001). "Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life." The American Journal of Medicine **111 Suppl 8A**(Journal Article): 69S-77S.
- Thach, B. T. (2008). "Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants." J Appl Physiol **104**(6): 1828-1834.
- Ulualp, S. O., S. Rodriguez, et al. (2007). "Pharyngeal pH monitoring in infants with laryngitis." Otolaryngol Head Neck Surg **137**(5): 776-779.
- Vaezi, M. F. (2003a). "Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease." Clinical cornerstone **5**(4): 32-38; discussion 39-40.
- Vaezi, M. F. (2003b). "Gastroesophageal reflux disease and the larynx." Journal of clinical gastroenterology **36**(3): 198-203.
- Vaezi, M. F. (2003c). "Sensitivity and specificity of reflux-attributed laryngeal lesions: experimental and clinical evidence." Am J Med **115 Suppl 3A**: 97S-104S.
- Vaezi, M. F. (2006). "Reflux-induced laryngitis (laryngopharyngeal reflux)." Current treatment options in gastroenterology **9**(1): 69-74.
- Vaezi, M. F., D. M. Hicks, et al. (2003). "Laryngeal signs and symptoms and gastroesophageal reflux disease (GERD): a critical assessment of cause and effect association." Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association **1**(5): 333-344.
- Vermeulen, D., P. Franco, et al. (2005). "Laryngeal oedema in neonatal apnoea and bradycardia syndrome (a pilot study)." Early Hum Dev **81**(4): 361-367.
- Vermeulen, R., B. Goderis, et al. (2004). "Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch." Biomacromolecules **5**(5): 1775-1786.
- Wennergren, G., T. Hertzberg, et al. (1989). "Hypoxia reinforces laryngeal reflex bradycardia in infants." Acta Paediatr Scand **78**(1): 11-17.
- Wetmore, R. F. (1993). "Effects of acid on the larynx of the maturing rabbit and their possible significance to the sudden infant death syndrome." The Laryngoscope **103**(11 Pt 1): 1242-1254.
- Widdicombe, J. (2001). "Airway receptors." Respir Physiol **125**(1-2): 3-15.
- Willinger, M., L. S. James, et al. (1991). "Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development." Pediatr Pathol **11**(5): 677-684.

- Xia, L., T. Damon, et al. (2007). "Unilateral microdialysis of gabazine in the dorsal medulla reverses thermal prolongation of the laryngeal chemoreflex in decerebrate piglets." J Appl Physiol **103**(5): 1864-1872.
- Xia, L., J. C. Leiter, et al. (2006). "Laryngeal water receptors are insensitive to body temperature in neonatal piglets." Respir Physiol Neurobiol **150**(1): 82-86.
- Xia, L., J. C. Leiter, et al. (2008). "Laryngeal apnea in rat pups: effects of age and body temperature." J Appl Physiol **104**(1): 269-274.
- Yellon, R. F. and H. Goldberg (2001). "Update on gastroesophageal reflux disease in pediatric airway disorders." Am J Med **111 Suppl 8A**: 78S-84S.
- Zhao, J., F. Gonzalez, et al. (2011). "Apnea of prematurity: from cause to treatment." Eur J Pediatr **170**(9): 1097-1105.